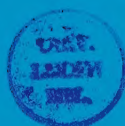


Zelldifferenzierung bei HYDRACTINIA ECHINATA

**Entstehung und Rolle der interstitiellen
Zellen während der Embryonalentwicklung;
Herstellung eines monoklonalen Antikörpers
als I-Zell-Marker**

Adelheid Munck

München 1986



ZELLDIFFERENZIERUNG BEI HYDRACTINIA ECHINATA
ENTSTEHUNG UND ROLLE DER INTERSTITIELLEN
ZELLEN WÄHREND DER EMBRYONALENTWICKLUNG;
HERSTELLUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS
ALS I-ZELL-MARKER

Dissertation
der Fakultät für Biologie
durchgeführt am Zoologischen Institut
der Ludwig-Maximilian-Universität München

vorgelegt von
Adelheid Munck
München im November 1986

1. Berichterstatter: Prof. Ch.N. David

2. Berichterstatter: Prof. H. Bohn

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	6
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1.	Haltung der Tiere	11
2.2.	Histologie	12
2.2.1.	Fixierungsmethoden	12
2.2.2.	Histologische Färbungen	13
2.2.3.	Quetschpräparate von Embryonen	14
2.2.4.	Mazeration	14
2.2.5.	Herstellung von Semidünnschnitten	15
2.2.6.	Bestimmung der Zellzahlen aus Semidünnschnitten	16
2.3.	Induktion der Metamorphose	17
2.4.	Herstellung von monoklonalen Antikörpern und Immuncytochemie	18
2.4.1.	Herstellung von monoklonalen Antikörpern	18
2.4.2.	Immuncytochemie	21
2.4.2.1.	Antikörpertest an verschiedenen Entwicklungsstadien	21
2.4.2.2.	Enzymbehandlungen	22
3.	ERGEBNISSE	23
3.1.	Zelldifferenzierung während der Embryonalentwicklung: Die Entstehung von Interstitiellen Zellen und ihren Abkömmlingen	23
3.1.1.	Allgemeiner Überblick über den Verlauf der Embryonalentwicklung	23
3.1.2.	Allgemeiner Überblick über Differenzierungsvorgänge während der Entwicklung	24
3.1.3.	Veränderung der Zellzahl während der Entwicklung	26
3.1.4.	Ergebnisse der Mazeration	30
3.1.5.	Frühentwicklung bis zur Präplanula	33
3.1.6.	Zelluläre Organisation der Larve	40
3.1.7.	Stadien der Planulaentwicklung unter Berücksichtigung einzelner Zelltypen	42
3.1.7.1.	Die Entwicklung der interstitiellen Zellen	42
3.1.7.2.	Entstehung von Nematoblasten und Nematocyten	49
3.1.7.3.	Nesselzelltypen der Planula	50

3.1.7.4.	Nervenzellen	52
3.1.7.5.	Schleimzellen	52
3.2.	Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen Hydractinia I-Zellen: Untersuchungen des Antigens in verschiedenen Entwicklungsstufen und verschiedenen Klonen von Hydractinia	53
3.2.1.	Produktion monoklonaler Antikörper gegen I-Zellen	53
3.2.2.	Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers	54
3.2.2.1.	Bindungsmuster bei Primärpolypen	56
3.2.2.2.	Bindungsmuster bei adulten Polypen	56
3.2.2.3.	Bindungsmuster bei den Larvenstadien	60
3.2.2.4.	Bindungsmuster an Schnittpräparaten bei verschiedenen Stadien	64
3.2.3.	Untersuchungen zur Klonspezifität des Antigens	68
3.2.3.1.	Vergleich des Bindungsmusters verschiedener Klone	68
3.2.3.2.	Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Klonspezifität des Antigens und Histokompatibilität	70
4.	DISKUSSION	72
4.1.	Entwicklung und Zelldifferenzierung: Histologische Befunde	72
4.1.1.	Überblick über die Entwicklung	72
4.1.2.	Frühentwicklung	74
4.1.2.1.	Furchung und Morulabildung	74
4.1.2.2.	Gastrulation	74
4.1.2.3.	Bildung eines Gastralraums durch Zelltod?	76
4.1.3.	Differenzierung verschiedener Zelltypen	77
4.1.3.1.	Die Entstehung der I-Zellen	77
4.1.3.2.	Die Entwicklung der Nesselzellen	81
4.1.3.3.	Herkunft der Nematoblasten	82
4.1.3.4.	Zellflußmodell zur Nematocyten-differenzierung	83
4.1.4.	Ein Modell zum Zellfluß während der Entwicklung	84
4.2.	Antigenspezifität bei Hydractinia	87
4.2.1.	Unterschiedliche Antikörperfärbung in Total- und Schnittpräparaten	87
4.2.2.	Antikörper als Differenzierungsmarker	88
4.2.2.1.	Das Antigen während der Embryonalentwicklung	88
4.2.2.2.	Schicksal des Antigens nach der Metamorphose und bei Adulten	89
4.3.	Klonspezifität des Antigens und Histokompatibilität	92

5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS	96
7.	ANHANG	108

1. EINLEITUNG

Die Hydrozoa gehören als Angehörige des Stammes der Coelenterata zu den primitivsten Vertretern der Metazoa. Sie besitzen ein knappes Dutzend verschiedener Zelltypen, die auf die beiden Epithelien, Ektoderm und Entoderm, verteilt sind. Aufgrund ihres einfachen Aufbaus sind sie für das Studium von Differenzierung und Musterbildung besonders geeignet (Gierer, 1974).

Viele dieser Zelltypen sind in den letzten Jahren gut untersucht worden, insbesondere beim Süßwasserpolytyp Hydra. Ihre Proliferations- und Differenzierungspotenzen wurden ausführlich beschrieben, wobei im Mittelpunkt häufig die interstitiellen Zellen (genannt I-Zellen), die als multipotente Stammzellen besonders interessant sind, standen (Campbell and David, 1974; Bode and David, 1978; David, 1982; Schmidt and David, 1986; Bosch, 1986). Anhand quantitativer Daten gelang der Entwurf eines Zellflußmodells, das die Differenzierung von I-Zellen zu Nematocyten und Nervenzellen beschreibt (David and Gierer, 1974).

Eine der Hauptfunktionen der interstitiellen Zellen, die erstmals bereits von Kleinenberg (1872) beschrieben wurden, ist die Bereitstellung von Vorläufern für die Bildung von Nesselzellen, Nervenzellen, Keimzellen und Drüsenzellen. Tiere ohne I-Zellen würden nach einiger Zeit zugrunde gehen, da sie wegen der fehlenden Nachproduktion von Nematocyten keine Beute mehr fangen könnten.

Aus zahlreichen embryologischen Studien an Cnidaria-Larven weiß man, daß zumindest bei einem Teil der untersuchten Arten die I-Zellen im Lauf der Embryonalentwicklung gebildet werden und daß sie auch in diesem Lebensabschnitt sowohl für verschiedene Differenzierungsleistungen als auch für die Metamorphose von essentieller Bedeutung sind (z.B. Weiler-Stolt, 1960; Müller, 1967; Martin and Thomas, 1977, 1981b).

In jüngster Zeit wurden bei Planularlarven^{von} *Pennaria tiarella*, eine mit *Hydractinia echinata* relativ nah verwandte Art, die Konsequenzen einer Elimination der I-Zellen qualitativ und quantitativ erfaßt (Martin and Thomas, 1981a; Martin, 1986): die Nematocytenproduktion fällt aus, die Nervenzellproduktion ist reduziert. Dieser Ansatz stellt eine prinzipielle Möglichkeit dar, die Larvenentwicklung unter neuen Gesichtspunkten im Vergleich zu rein morphologisch deskriptiven zu erfassen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde versucht, ein genaues Bild über Entstehung und Vermehrung verschiedener Zelltypen und über die Differenzierungsleistungen von I-Zellen während der Embryonalentwicklung einer Hydrozoenlarve, der Planula von *Hydractinia echinata*, zu gewinnen. *Hydractinia* ist eine marine koloniebildende Hydrozoenart, in deren metagenetischem Entwicklungszyklus neben der sessilen Polypengeneration eine geschlechtlich erzeugte Planularlarve auftritt. Die Polypen vermehren sich vegetativ auf von Einsiedlerkrebsen bewohnten Schneckenschalen (vorwiegend *Buccinum* und *Littorina*). Neben Nährpolypen (Gastrozooide) enthalten die Kolonien weitere spezialisierte Polypen, nämlich getrenntgeschlechtliche Geschlechtspolypen (Gonozooide oder Blastostyle) und Wehrpolypen (Spiralzooide). Grundlegende Untersuchungen der Stock- und Polypendifferenzierung wurden von Hauenschild und Kanellis (1954), Müller (1964) und McFadden et al. (1984) durchgeführt.

Die Gastrozooide sind in ihrem Grundbauplan dem von *Hydra* sehr ähnlich. Das Ektoderm besteht aus Epithelmuskelzellen, in deren Interzellularräumen sich I-Zellen und deren Produkte (Differenzierungsstadien von Nesselzellen, Nervenzellen) befinden. Das Entoderm besteht aus entodermalen Epithelzellen, die als Nährzellen fungieren. Dazwischen befinden sich verschiedene Typen von Schleim- und Drüsenzellen. Das Tentakelentoderm ist eine einzellige Schicht, die von einer ebenfalls einzelligen ektodermalen Schicht von Epithelmuskelzellen, die zudem zahlreiche ausgereifte Nesselkapseln beherbergt, umgeben ist. Die

beiden Körperschichten sind durch die azelluläre Stützlamelle, die Mesogloea, voneinander getrennt. Der Bauplan der als reduzierte Medusengeneration betrachteten Blastostyle ist etwas abgewandelt (Kühn, 1914). Der Rumpf, der sehr ähnlich aufgebaut ist wie bei Gastrozoiden, enthält zusätzlich die Keimzellen. Diese sind Abkömmlinge von I-Zellen, die unterhalb des Polypenköpfchens, in der sog. Gonophorensprossungszone vom Ektoderm ins Entoderm einwandern und dort in nachfolgenden Ausstülpungen der Körperwand, den Gonophoren, als Gametenvorstufen heranwachsen. Die Reifung der Keimzellen schreitet von oben nach unten voran, so daß an der Basis des Blastostyls die Gonophoren mit den reifsten Eiern oder Spermien sind. Die Blastostyle sind unfähig zum Beutefang, ihre Tentakel sind zu rudimentären Tentakuloiden umgebildet und das Polypenköpfchen besitzt Exkretionsfunktion. Der Stock kann erst Geschlechtspolypen bilden, wenn die Dichte der Gastrozooide ein bestimmtes Maß erreicht hat.

In älteren Untersuchungen über die Entwicklung der Larven verschiedener Spezies wurden z.T. sehr detaillierte morphologische Angaben zur Entstehung der beiden Keimblätter und der verschiedenen Zelltypen gemacht. Der Entwicklung der Planulae von *Hydractinia echinata* wurde bereits 1894 von Bunting eine Arbeit gewidmet, eine neuere Untersuchung liegt von van de Vyver (1964) vor. Die Differenzierung vor allem des Ektoderms wurde von Weis et. al (1985) ultrastrukturell untersucht.

Es liegen jedoch meist nur sehr vage quantitative Daten vor. Hier sollte nun mit Hilfe verschiedener Techniken, Semidünnschnitten und einer dafür entwickelten Mazerationsmethode das Bild der Planula-Entwicklung ergänzt werden, um eine Vorstellung über den Zellfluß während dieses Entwicklungsabschnitts zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, daß I-Zellen zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt entstehen, als bisher angenommen. Ein Differenzierungsmodell wird vorgeschlagen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte von einer Möglichkeit der Charakterisierung von Zellen Gebrauch gemacht werden, die in letzter Zeit immer aktueller geworden ist: Die Markierung von Zelltypen mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene. Hiermit ist ein weiteres Kriterium vorhanden, einen bestimmten Differenzierungszustand festzustellen, denn man kann davon ausgehen, daß sich Veränderungen im Inneren der Zellen teilweise auf der Zelloberfläche in Gestalt von Antigenen widerspiegeln (Boyse and Old, 1969; Springer, 1980).

Bei Säugern, vor allem bei der Maus werden monoklonale Antikörper schon seit längerer Zeit eingesetzt, um Unterschiede der Zelloberfläche bei verschiedenen Zelltypen zu studieren (z.B. Gachelin et al., 1977; Fenderson et al., 1984).

Auch bei Wirbellosen wurden in jüngerer Zeit monoklonale Antikörper als Differenzierungsmarker entdeckt. So wurden bei *Drosophila* sowohl stadienspezifische, z.B. gegen Polzellen (Watanabe et al., 1982), gegen Axone embryonaler Neuronen (Carnegie et al., 1982) und gegen Zellen während der Differenzierung des Ovars (White et al., 1984), als auch positionsabhängige Antigene (Brower et al., 1985) gefunden. Hierbei wird immer wieder die mögliche Bedeutung solcher Antigene bei der Zell-Zell-Erkennung und Zelladhäsion betont (Spragg et al., Goodman et al., 1984; Brower et al., 1985; Bedian et al., 1986).

Da es in letzter Zeit gelungen ist, auch für *Hydra* zelltypspezifische monoklonale Antikörper zu erzeugen (Littlefield et al., 1985; Dunne et al., 1985; Yaross et al., 1986; Schmidt and David, 1986), um im intakten Gewebe diese Zellen selektiv zu markieren, wurde dieser Ansatz bei *Hydractinia* versucht. Wegen der Kleinheit der Tiere ist gerade die Antikörpermarkierung an Totalpräparaten eine sehr aufschlußreiche Methode, um Informationen über die spezielle Lokalisation der markierten Zelltypen zu erhalten.

Es gelang, einen spezifischen Marker für I-Zellen zu erzeugen, mit dessen Hilfe man hoffte, die Genese dieses Zelltyps in der Embryonalentwicklung zurückverfolgen zu

können. Im Lauf der Untersuchung dieses I-Zell-Antikörpers stellte sich heraus, daß die spezifische Antikörperreaktion zur Kennzeichnung früher I-Zell-Stadien nicht geeignet ist. Vielmehr ist die Antigenizität ein Kennzeichen "adulter" I-Zellen und einiger Derivate und stellt somit einen Differenzierungsmarker einiger adulter Gewebe dar.



2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Haltung der Tiere

Die Versorgung mit Tieren erfolgte durch die Biologische Anstalt Helgoland. Während des ersten Versuchszeitraums (Sommer 1984-1985) wurden die Tiere in Glasschalen von etwa 30cm Durchmesser gehalten. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Kolonien meistens relativ schnell, d.h. nach 3-4 Wochen zu einem großen Teil abstarben. Daraufhin wurden sie in einem 100-l-Aquarium gehalten, wobei die von den Kolonien besiedelten Schneckenhäuser einzeln an dünnen Plastikfäden im Wasser aufgehängt wurden, um ein Aufliegen am Boden zu vermeiden und eine gute Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Künstliches Seewasser wurde aus synthetischem Meersalz (Tropic Marin Neu, Firma Tagis-Aquarium, Dreieich; 625 g/20 l ergibt etwa die Dichte von Nordseewasser) hergestellt. Die Kolonien wurden 3-4 mal pro Woche mit 2-3 Tage alten Nauplien von *Artemia* sp. gefüttert, indem die Kolonien zusammen mit den Nauplien für einige Stunden zur Futteraufnahme in große Glasschalen gegeben wurden. Zum Ablachen wurden die Kolonien über Nacht in den Glasschalen bei 18°C im Dunkeln gehalten. Das Ablachen erfolgte am Morgen etwa 1 h nach Anschalten des Lichts. Die sich im Anschluß entwickelnden Larven wurden in kleine Glasschälchen (etwa 10 cm Durchmesser) in gefiltertes Seewasser überführt, wo sie mindestens bis zum Erreichen des ausgewachsenen Planulastadiums verblieben. Die Planularlarven konnten bei 4°C bis zu 6 Wochen in Petrischalen aufbewahrt werden.

2.2. Histologie

2.2.1. Fixierungsmethoden

Paraformaldehyd (PFA):

4% Paraformaldehyd wurde in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.0 bei 60°C unter Rühren gelöst. Wenn die Lösung nicht ganz klar war, wurde sie filtriert. Vor dem Fixieren mußte sie auf Eis gestellt werden. PFA sollte immer frisch angesetzt werden (höchstens 2-3 Tage alt).

Es wurde für 24 h in der Kälte fixiert.

Bouin's Fixativ (Pikrinsäure-Formol-Eisessig) nach Romeis (1968), § 304:

Die Fixierung erfolgte für 24 h bei Raumtemperatur; das Material kann in 70% Äthanol aufbewahrt werden (mehrmals wechseln zur Entfernung der Pikrinsäure).

Lavdowsky's Fixativ (Campbell, 1983):

Die Fixierlösung besteht aus 50 ml 37% Formaldehyd, 20 ml konzentriertem Eisessig, 250 ml 96% Äthanol und 200 ml Aqua dest.. Sie kann in größeren Mengen angesetzt und bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die Fixierung erfolgte für 24 h bei Raumtemperatur.

Fixierung für Kunststoffeinbettung mit

PFA/Glutaraldehyd/Acrolein:

Reagenzien: Lösung A (vor der Fixierung frisch angesetzt):

3% PFA, pH 7.0, 4% Glutaraldehyd und 2% Acrolein.

Lösung B: 0.2 M Cacodylatpuffer, mit NaOH auf pH 7.2 titriert.

Für die Verwendung als Waschpuffer wurde 20% Saccharose zugesetzt, für die Endkonzentration von 10% in 0.1 M Puffer wurde 1:1 verdünnt.

Unmittelbar vor der Fixierung wurden Lösung A und B (Cacodylatpuffer 0.1 M ohne Saccharose) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Reagenzien müssen kalt sein, die Fixierung wurde auf Eis durchgeführt. Von den ebenfalls kalt gestellten Tieren wurde das Seewasser entfernt, das Fixiergemisch zugegeben, einmal gewechselt und für 2-4 h

inkubiert. Danach erfolgte dreimaliges Waschen in der Waschlösung für jeweils 30 min..

Für die Elektronenmikroskopie, durchgeführt von Dr. Wolfgang Schäfer, Universität Erlangen, wurde das Material mit 2% OsO_4 für eine Stunde nachfixiert und anschließend noch dreimal wie oben gewaschen.

Anschließend wurde für je 20 min. in 30%, 50% und 70% Äthanol entwässert. In 70% Äthanol kann das fixierte Material aufbewahrt werden.

Betäuben der Tiere:

Die Polypen müssen vor dem Fixieren betäubt werden, um eine zu starke Kontraktion zu verhindern. Dazu wurden sie für 15-20 min. in 0.2 M MgCl_2 -Seewasser inkubiert.

2.2.2. Histologische Färbungen

Toluidinblau (nach Campbell, 1983):

Reagenzien: 0.05% Toluidinblau O (Merck) in 0.01 M Tris, pH 8.0

Semidünnschnitte wurden ohne Entfernen des Kunsthharzes direkt für 2-10 min. in der Farblösung inkubiert. Dann wurde in Wasser gespült und luftgetrocknet. Bei Überfärbung kann in 70% Äthanol entfärbt werden. Als Eindeckmittel wurde DePeX (Merck) verwendet.

Paraffinschnitte wurden in Xylol entparaffiniert und über die absteigende Alkoholreihe hydriert. Die Inkubationsdauer in der Farblösung betrug 2 min.. Das Differenzieren erfolgte für einige Sekunden bis Minuten in 70% , für 5-10 min. in 96% Äthanol; die genauen Zeiten mußten vor jeder Färbeserie ausgetestet werden. Nach einem weiteren Entwässerungsschritt in 100% Äthanol (10 min.) und 2 mal Xylol (je 10 min.) wurde das Präparat mit DePeX eingedeckt.

Bei Totalpräparaten wurde nach dem Hydrieren über die absteigende Alkoholreihe analog verfahren. Auch hier mußten die Färbe- und Differenzierungszeiten immer wieder neu ausgetestet werden.

Azur-Eosin-Methylenblau:

Reagenzien: 1% Azur-Eosin-Methylenblau (Merck) wurde in Aqua dest. gelöst (gesättigte Lösung) und filtriert. Für die Färbung wurde diese Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Semidünnschnitte wurden für ca. 20 min. gefärbt, mit Wasser abgespült, luftgetrocknet und mit DePeX eingedeckt.

2.2.3. Quetschpräparate von Embryonen (abgewandelt nach Gossett and Hecht, 1980)

Embryonen wurden einzeln auf Gelatine-beschichtete Objektträger pipettiert, das Wasser gut abgesaugt und ein silikonisiertes Deckglas senkrecht von oben aufgesetzt. Das Deckglas wurde leicht angedrückt und der Objektträger wurde für ca. 0.5 min. bei -80°C eingefroren. Das Deckglas wurde mit einer Skalpellklinge abgesprengt und das Präparat für 20 min. in eiskaltem Methanol fixiert. Dann wurde Aceton aufgetropft, abgeschüttelt und das Präparat luftgetrocknet. Zum Sichtbarmachen der Zellkerne wurden diese mit DAPI-Lösung (1 ng/ml in PBS), einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert (Cowden and Curtis, 1981) beschickt und im Fluoreszenzmikroskop angeschaut.

2.2.4. Mazeration

10-30 Larven wurden in ein Plastiktöpfchen (ca. 2 ml Volumen) pipettiert, das Seewasser anschließend mit einer ausgezogenen Pasteurpipette sorgfältig abgesaugt. Vor der eigentlichen Mazeration erfolgte eine enzymatische Vorbehandlung mit 0.5 mg/ml Cellulase (Cellulase "Onozuka" aus *Trichoderma viride*, Serva) in Ca-freiem Seewasser (0.484 M NaCl, 0.01 M KCl, 0.027 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.029 M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0024 M NaHCO_3 , 0.005 M HEPES od. Tris, pH 6.7) (eingestellt mit 1mM Acetat-Puffer, pH 4.4) im Wasserbad bei 35°C . Pro Töpfchen wurden etwa 200 μl eingesetzt. Die

Inkubationsdauer variierte je nach Alter der zu mazerierenden Larven. Bei Präplanulastadien ab 20 h genügten 20 min., mit zunehmendem Alter wurde diese Zeit verlängert bis zu 60 min. bei 3 Tage alten ausgewachsenen Planularlarven.

Nach der Vorbehandlung wurden die Gefäße aus dem Wasserbad genommen und es wurde bei Raumtemperatur weitergearbeitet. Etwa die Hälfte des Mediums wurde mit einer ausgezogenen Pipette abgesaugt, der Rest wurde durch die gleiche Menge Mazerationslösung, bestehend aus Essigsäure, Glycerin und Aqua dest. im Verhältnis 1:1:7, ergänzt. Der Ansatz wurde 5-10 min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Durch Hin- und Herbewegen des Gefäßes und leichtes Klopfen auf der Unterlage wurde das Gewebe mazeriert. Der Zerfall des Gewebes sollte zur Kontrolle unter dem Binokular verfolgt werden.

Die so erhaltene Zellsuspension wurde auf Gelatinebeschichteten Objektträgern, auf die zuvor ein kleiner Tropfen 1% Tween zur Herabsetzung der Oberflächenspannung pipettiert worden war, ausgestrichen und konnte nach Antrocknen (am besten über Nacht) im Phasenkontrast-Mikroskop ausgezählt werden. Aus der Anzahl der Zellen/Objektträger ließ sich unter Berücksichtigung des Volumens der Ausgangs-Zellsuspension, Anzahl der eingesetzten Larven und Volumen (25 oder 50 µl) der pro Objektträger ausgestrichenen Zellsuspension, die Anzahl der Zellen pro Larve berechnen.

2.2.5. Herstellung von Semidünnschnitten

Paraffinschnitte:

Die Einbettung erfolgte nach Entwässerung über Butanol in Paraplast, wobei die Larven in 96% Äthanol mit 0.1% Eosin zur besseren Sichtbarmachung gefärbt wurden.

Die Dicke der Schnitte betrug zwischen 5 und 8 µm. Sie wurden auf Gelatine beschichteten Objektträgern bei ca. 55°C für eine bis mehrere Stunden getrocknet, wodurch ein

Abschwimmen der Schnitte bei der nachfolgenden Immunhistochemie verhindert werden konnte.

Semidünnschnitte:

Die Einbettung erfolgte in Glykol-Methacrylat (GMA; Historesin, LKB). Die Methode wurde im Wesentlichen der Arbeit von Werner (1984) entnommen. Nach vollständiger Entwässerung wurde zuerst in 96% Äthanol/aktiviertem GMA-Monomer im Verhältnis 1:1 für 1 h infiltriert, anschließend für jeweils einige Stunden mit reinem aktiviertem GMA-Monomer, wobei die Lösung zweimal gewechselt wurde. Für die Einbettung wurde unmittelbar vorher dem aktivierten Monomer Härter (Benzoylperoxid) zur Polymerisation zugesetzt (1ml Härter/15 ml Monomer). Die Polymerisation erfolgte in LKB Einbettformen im Kühlschrank über Nacht, dann noch 1-2 Tage bei Raumtemperatur.

Für die Immunhistochemie wurde neben der oben genannten Standardeinbettung wahlweise nur bis 80% Äthanol entwässert bzw. die Infiltration bei 4°C unter Rühren durchgeführt. Auf einem Reichert-Autocut Mikrotom wurde mit Metall-Einwegmessern (Kulzer) mit 2 µm geschnitten. Die Schnitte wurden auf Gelatine-beschichteten Objektträgern angetrocknet.

2.2.6. Bestimmung der Zellzahlen aus Semidünnschnitten

Die Anzahl der Zellkerne wurde in jeweils 5 bis 10 relativ medianen Längsschnitten einer Larve ausgezählt, und die Gesamtzellzahl daraus rechnerisch ermittelt. Da die Larven nicht regelmäßig geometrisch geformt sind, kann die Berechnung nur näherungsweise erfolgen (Formeln nach Bronstein und Semendjajew, 1975).

15 h Stadien sind ziemlich rund, es wurde also eine Kugelform zugrunde gelegt. Für einen Schnitt der Dicke d durch den Kugelmittelpunkt gilt die Beziehung: Die Zelldichte in der Kugel $N_{\text{Kugel}} = N_{\text{Schnitt}} \cdot D^3 / (6 \cdot R^2 \cdot d)$, wobei D=Durchmesser, R=Radius und d=Schnittdicke ist.

Ältere Stadien, die ab 20 h oval werden, sind in grober Näherung rotationssymmetrisch ellipsoid, können also als Rotationsellipsoid behandelt werden. Für einen Schnitt der Dicke d durch die mediane Längsachse eines

Rotationsellipsoids gilt die Beziehung: Die Zelldichte im Rotationsellipsoid $N_{\text{ellipsoid}} = N_{\text{schnitt}} \cdot 4/3 \cdot R/d$, wobei R =Radius und d =Schnittdicke ist.

Es muß noch berücksichtigt werden, daß Zellkerne, deren Durchmesser größer ist als die Schnittdicke, in aufeinanderfolgenden Schnitten mehrmals gezählt werden. Deshalb muß das Ergebnis durch einen Faktor geteilt werden, der sich aus dem Verhältnis Kerndurchmesser:Schnittdicke ergibt; also muß z.B. bei einem Zellkerndurchmesser von 6 μm und einer Schnittdicke von 2 μm durch den Faktor 3 dividiert werden. Bei nicht runden Zellkernen und ovalen Nesselkapseln wurde unter der Annahme, daß die Orientierung zufällig ist, der Faktor aus dem Mittelwert aus Länge und Breite berechnet. Dies gilt sowohl für die Berechnung mit den genannten Formeln als auch für das Auszählen von Schnittserien.

Voraussetzung für diese Näherungen ist, daß die Zellen in Bezug auf die Rotationsachse homogen verteilt sind. Da Planulae radiärsymmetrisch sind, kann diese Annahme gemacht werden.

Zur Kontrolle dieser Berechnung wurden einige Schnittserien von Präplanulae und Planulae direkt ausgezählt. Die Abweichungen von den Zellzahlen, die rechnerisch wie oben beschrieben ermittelt wurden, waren unter 10%. Abweichungen dieser Größenordnung traten auch innerhalb der direkt ausgezählten Larven auf; d.h. der Fehler, der durch die berechnete Näherung auftritt, liegt im Bereich des Zählfehlers.

2.3. Induktion der Metamorphose

Die Metamorphose von Planulae kann durch geringe Dosen von CsCl induziert werden (Müller and Buchal, 1973). Die Larven wurden für 3-4 h in 60 mM CsCl-Seewasser inkubiert, danach

mehrmals gründlich mit filtriertem Seewasser gewaschen. Nach 48 h hatten die Primärpolypen bereits kleine Stolonen und Tentakel.

2.4. Herstellung von monoklonalen Antikörpern und Immuncytochemie

2.4.1. Herstellung von monoklonalen Antikörpern (MA)

Praktische Anleitungen zu Zellkulturmethoden wurden allgemeinen Büchern entnommen (Mishell and Shiigi, 1980; Goding, 1983)

Das Protokoll zur Herstellung der MA folgt im Wesentlichen der Arbeit von Oi und Herzenberg (1980).

Immunisierung und Fusion:

Zur Immunisierung wurden jeweils ca. 200 Primärpolypen (entsprechend etwa 2×10^6 Zellen), deren Köpfe vorher entfernt worden waren, verwendet. Sie wurden von Objektträgern, auf denen sie festgewachsen waren, abgeschabt, grob dissoziiert und abzentrifugiert. Aufgenommen in 250 μ l MDP-Lösung (Muramyl-dipeptid, Institut Pasteur, Paris; 100 μ g wurden in 250 μ l PBS gelöst) wurden sie 8 Wochen alten weiblichen BALB/C Mäusen intraperitoneal injiziert. Drei Wochen später wurde zur Verstärkung der Immunantwort die Injektion mit derselben Menge von Zellen wiederholt, drei Tage danach wurde die Milz entnommen und aufgearbeitet. Da zu diesem Zeitpunkt eine unvorhergesehene Kontamination im CO₂-Inkubator aufgetreten war, konnte die Fusion nicht wie geplant sofort durchgeführt werden, deshalb wurden die Milzzellen vorübergehend in flüssigem N₂ eingefroren. Für die Fusion, die dann zwei Wochen später durchgeführt wurde, wurden 10^8 Milzzellen und 2×10^7 Myelomazellen der Zelllinie P3X-6AG8653 eingesetzt und in Anwesenheit von Polyethylenglykol (Galfre et al., 1977) fusioniert. Um von vorne herein eine größere Verdünnung der Klone zu erzielen, wurde in 96-Loch Mikrotiterplatten mit

Makrophagen-feederlayer ausplattiert. Die Hybridomazellen wurden mit HAT-Medium selektiert.

Screening:

Zum Testen der Überstände an Primärpolypen wurde folgendes Testsystem entwickelt. Von 96-Loch Mikrotiterplatten wurde der Boden entfernt und an seine Stelle wurden zurechtgeschnittene Deckgläser aufgeklebt. Auf diese Weise erhielt man Mikrotiterplatten mit dünnem Glasboden. Zum Mikroskopieren wurde die Platte umgedreht (kleine Volumina viskoser Flüssigkeiten wie z.B. Glycerin liefen aufgrund der Oberflächenspannung auch beim Umdrehen kaum aus dem Loch heraus) und die Zellen in dem betreffenden Loch konnten von unten auch mit stärkeren Objektiven angeschaut werden. In den Löchern der so vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden dann jeweils 5-10 Planulae zur Metamorphose induziert, drei bis vier Tage später wurden die dort festsitzenden Primärpolypen in 4% PFA fixiert und bis zum Testen aufbewahrt.

Der Test wurde in Anlehnung an die von Grimmelikhuijzen (1985) angegebene Methode mit Indirekter Immunfluoreszenz (IIF) entwickelt. Die fixierten Tiere wurden bei Raumtemperatur in 0.1 M Phosphatpuffer, pH 7.0 gründlich gewaschen, im Verlauf von 2 h wurde der Waschpuffer 2-3 mal gewechselt. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde anschließend für 4 h im Phosphatpuffer/0.4 M Glycin inkubiert. Als Puffer für alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurde 0.15 M Phosphat-gepufferte Saline (PBS), pH 7.2 verwendet. Nach dem Blockieren erfolgte zur Permeabilisierung des Gewebes und der Zellmembranen eine 2-stündige Behandlung mit 0.25% Triton in PBS/0.25% BSA/0.01% Azid (allen Lösungen, die BSA oder FCS enthielten, wurde 0.01% Azid zur Verhinderung von Bakterien- und Pilzwachstum zugesetzt). Dann wurde mit je 50 µl/Loch des zu testenden Hybridomaüberstands über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Hybridoma-Überstand wurde beim Screening unverdünnt verwendet. Am nächsten Tag wurde der Überstand sorgfältig entfernt und im Verlauf von 30 min. mit PBS/0.25% Triton/0.25% BSA (2-3 mal gewechselt) gewaschen. Die Inkubation mit dem 2. Fluorescein-konjugierten Antikörper,

hier Fluorescein-Isothiocyanat-konjugiertes (FITC) Kaninchen-Anti-Maus IgG+IgM (Tago, Burlingame, California), verdünnt 1:50 mit PBS/Triton/BSA, erfolgte für 1-2 h bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des FITCs wurden die Tiere wiederum für 30 min. wie oben gründlich gewaschen. Kontrollpräparate wurden ganz ohne Antikörper (Kontrolle der Eigenfluoreszenz des Gewebes) und nur mit dem 2. Antikörper (Kontrolle unspezifischer Bindungen) hergestellt. Zur Unterdrückung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz konnte mit 1% Evans Blau (Merck) in PBS/0.25% Triton für 2-3 min. gegengefärbt werden. Anschließend wurden die dunkelblauen Tiere nochmals so lange gewaschen, bis sie keine Farbe mehr abgaben. Die Löcher wurden mit je 40 µl Glycerin/PBS im Verhältnis 9:1, dem zur Verminderung des Ausbleichens der Fluoreszenz 10 µg/ml Phenylendiamin (Sigma) (Johnson and Araujo, 1981) zugesetzt war, beschickt. Die Untersuchung der Präparate erfolgte in einem Leitz Dialux 20 Fluoreszenz-Mikroskop. Für FITC wird der Filterblock I2 verwendet (Anregung bei 450-490 nm; Sperrfilter 580 nm). Fluorescein besitzt eine grüne Fluoreszenz, Evans Blau ergibt bei dieser Wellenlänge eine rote Gegenfärbung.

Klonierung:

Positive Klone wurden in 24-Loch-Platten weitergezüchtet. Die Klonierung erfolgte nach der Methode des "limiting dilution" (Kennet, 1980), wobei mit Verdünnungen auf 10, 3 und 1 Zelle pro Loch gearbeitet wurde. Bei der Verdünnung, bei der etwa in 30% der Löcher Zellen wachsen, kann man davon ausgehen, daß man tatsächlich Monoklone hat. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Medium (Gibco) mit . Glutaminsäure unter Zusatz von 1% Pennicillin/Streptomycin (Gibco) und 10% Fötalem Kälberserum (Gibco) verwendet. Die Zellen wurden alle 4-5 Tage durch Zugabe von Makrophagen (zur Produktion von Wachstumsfaktoren) "gefüttert".

2.4.2. Immuncytochemie

2.4.2.1. Antikörpertest an verschiedenen Entwicklungsstadien

Antikörpertests an Totalpräparaten von Larven und Polypen mit IIF:

Die Tests wurden wie die der Hybridomaüberstände durchgeführt. Der Antikörperüberstand wurde allerdings 1:4 verdünnt. Zum Inkubieren mit Wasch-, Blockier- und Antikörperlösungen wurden die PFA-fixierten Tiere in Mikrotiterplatten, zum Mikroskopieren auf Objektträger überführt. Zum Permeabilisieren wurde alternativ zu Triton auch 80-100% Äthanol verwendet.

Antikörpertests an Paraffinschnitten (abgewandelt nach Littlefield et al., 1985) und Semidünnschnitten mit IIF:

Die Schnitte wurden auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgebracht und bei ca. 50°C für mindestens 1 h angetrocknet. Nach Entfernung des Paraffins und Hydrieren der Schnitte wurden diese für 10 min in PBS gespült. Alle Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer, die Schnitte dürfen nicht austrocknen; gewaschen wurde mit reichlicher Waschlösung in einer Färbeküvette. Zum Blockieren wurde mit 10% FCS in PBS oder 3% Magermilchpulver für 30 min. inkubiert. Alternativ dazu wurde auch mit 20, 50 und 100% FCS, mit Ziegen Serum blockiert. Nach Entfernung der Blockierlösung wurde für 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank mit dem 1. Antikörper inkubiert. Anschließend wurde wie bei Totalpräparaten verfahren. Semidünnschnitte wurden ohne Vorbehandlung in PBS für 10 min. hydriert und dann wie Paraffinschnitte weiterbehandelt.

Indirekter Immunoperoxidase Test (HRP):

Der Test wurde nach einer Anleitung von Bourne (1983) an Paraffinschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden entparaffiniert, hydriert und in Puffer gewaschen wie oben angegeben. Vor dem Blockieren wurde mit 3% H₂O₂ für 5 min. inkubiert, um evtl. vorhandene interne Peroxidasen zu inaktivieren. Der 1. Antikörper wurde in der Verdünnung 1:50 eingesetzt und wie oben inkubiert. Danach erfolgte die

Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem 2. Kaninchen-Anti-Maus IgG+IgM (Sigma), verdünnt 1:50, für 30 min. bei Raumtemperatur. Als Substrat diente Diaminobenzidin (3,3 DAB-Tetrahydrochloride, Sigma), wobei 6 mg DAB in 10 ml 0.05 M Trispuffer, pH 7.6 gelöst wurden. Die Substratlösung wurde jedesmal frisch zubereitet, zum Start der Reaktion wurden 0.1 ml 3% H₂O₂ zugegeben. Jeweils ca. 5 Tropfen dieser Lösung wurden auf einen Objekträger aufgetropft, nach 5 min. gründlich mit Wasser abgespült und mit Toluidinblau gegengefärbt.

2.4.2.2. Enzymbehandlungen

Trypsin-Behandlung von Paraffin- und Semidünnschnitten:

Reagenzien: 0.1% Trypsin (Worthington Biochemical Corp. Freehold, New Jersey) in H₂O/0.1% CaCl₂, pH 7.8 (eingestellt mit 0.1 M NaOH)

Die Inkubation mit Trypsin erfolgte für 2-4 h bei 37°C unmittelbar vor dem Blockieren. Ab hier wurde der Antikörpertest wie beschrieben durchgeführt.

Pronase-Behandlung von Paraffin- und Semidünnschnitten:

Reagenzien: 0.1% Pronase (von Streptomyces griseus, Calbiochem) in 0.5 M Tris/HCl, pH 7.6

Die Inkubation mit Pronase erfolgte für 15 min. bei 37°C unmittelbar vor dem Blockieren. Ab hier wurde der Antikörpertest wie beschrieben durchgeführt.

Die Entwicklung läßt sich in mehrere Abschnitte gliedern. Etwa 30 min. nach der Befruchtung beginnt die erste Furchungsteilung. Innerhalb der ersten 5 h wird eine Morula gebildet, durch weiterhin rasche Zellteilung entsteht ein solider sphärischer Keim, wobei die Zellgröße mit zunehmender Zellzahl abnimmt. Der Keim beginnt im Alter von ca. 15 h allmählich eine ovalere Gestalt anzunehmen. Die Ausbildung der Mesogloea beginnt im Alter von etwa 20 h, mit 25 bis 28 h ist sie vollendet. Der Keim wird stetig länglicher und im Alter von 30 h ist das Stadium der Präplanula erreicht.

Ihre endgültige längliche Form mit einem breiteren anterioren Pol und einem dünn ausgezogenen posterioren Pol hat die Planula nach 2-3 Tagen erlangt. Ab etwa drei Tagen ist sie bei Auffinden eines geeigneten Substrats (Müller und Buchal, 1973) in der Lage, sich festzusetzen und in die Metamorphose zu gehen.

3.1.2. Allgemeiner Überblick über Differenzierungsvorgänge während der Entwicklung

Parallel zur Zellvermehrung und zur Veränderung der äußeren Morphologie der Larve findet in den verschiedenen Entwicklungsabschnitten die Differenzierung verschiedener Zelltypen statt. Dabei handelt es sich teilweise um typische larvale Zelltypen, und teilweise um Zelltypen, die bereits hier für das Dasein nach der Metamorphose angelegt werden. Einige Zelltypen sind in früheren Arbeiten, hauptsächlich bei van de Vyver (1964), näher beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden Larvenstadien verschiedener Alterstufen zwischen 8 und 200 h in Schnittpräparaten untersucht.

Die frühen Stadien (8 h) bestehen aus morphologisch gleichartigen, dotterreichen Blastomeren.

Einige Stunden vor Bildung der Stützlamelle kann bereits eine lokale Sonderung in zwei morphologisch verschiedene Zellschichten erkannt werden (15 h): die den Keim nach außen

abgrenzenden eher länglichen Epithelzellen und die prospektiven Entodermzellen im Inneren.

In Schnitten von 20 h alten, inzwischen ovalen Larven wird die beginnende Bildung der Mesogloea sichtbar. Die qualitative Zellzusammensetzung der Larve ist ähnlich wie bei 15 h, lediglich die Zellzahlen haben sich verändert.

Nachfolgend beginnt eine Phase der Zelldifferenzierung. Erste in Schnittpräparaten sichtbare Produkte, deren Differenzierung im Folgenden noch ausführlich behandelt wird, sind interstitielle Zellen (I-Zellen) und Nematoblasten im Entoderm der Präplanula (ab 25 h).

Ab 50 h etwa ist die Larve mit allen charakteristischen Zelltypen einer ausdifferenzierten Planula ausgestattet. Neben den Nematoblasten im Entoderm befindet sich im Ektoderm bereits eine größere Zahl ausdifferenzierter Nematocyten. Zwischen den ektodermalen Epithelzellen sind inzwischen auch die auf das Planulastadium beschränkten Schleimzellen entstanden. Ebenfalls zu diesem Zeitpunkt besitzt die Larve Nervenzellen. Sie können zwar nicht in den Schnitten, aber in Mazeraten (s. Kap.3.1.4.) identifiziert werden. Über ihre Lokalisation im Ektoderm berichtet Weis et al. (1985) in einer ultrastrukturellen Untersuchung von *Hydractinia*.

Bis die Planula nach normalerweise frühestens 3 Tagen in die Metamorphose geht, findet eine Vermehrung der differenzierenden und differenzierten Zelltypen mit begleitenden Zellwanderungen statt. Die Nematocyten wandern in großen Mengen ins Ektoderm, vor allem das posteriore Ende der Planula ist schließlich dicht besetzt. Die I-Zellen beginnen kurz vor der Metamorphose vor allem ins anteriore Ektoderm auszuwandern, während der Metamorphose findet der Austritt dorthin dann in großen Mengen statt.

3.1.3. Veränderung der Zellzahl während der Entwicklung

Die Zellzahlen wurden bei sehr frühen Stadien z.T. aus Quetschpräparaten und bei allen übrigen Stadien aus Mazerations- und Schnittpräparaten ermittelt. Sie sind in Tab.1 zusammengefaßt.

Wenn man die Veränderung der Gesamtzellzahl (Abb.2) betrachtet, läßt sich die Entwicklung in mehrere Abschnitte gliedern. Während der ersten 7-8 h findet eine sehr schnelle Folge von Furchungsteilungen statt, ein Furchungszyklus benötigt weniger als eine Stunde. Im Alter von 8 h enthält der Keim 200-250 Blastomeren. Danach wird die Zunahme der Blastomeren durch eine Verlängerung des Teilungszyklus verlangsamt. Diese Verlängerung scheint mit der Entstehung von zwei Zellschichten (s. Schnittpräparate von 8 und 15 h) zusammenzufallen.

Im Präplanulastadium ist die Zellvermehrung schon fast abgeschlossen, die Larven bestehen aus ungefähr 8000 Zellen, wobei das Ektoderm 6000 Zellen und das Entoderm 2000 Zellen enthält. Die Anzahl unterliegt ziemlich großen Schwankungen, entsprechend den erheblichen Größenunterschieden zwischen Individuen.

Innerhalb der nächsten 20 h findet nur noch ein geringer Anstieg der Zellzahl auf etwa 10000 Zellen statt. Die Zunahme der Gesamtzellzahl ist ab 50 h ausschließlich auf die Vermehrung differenzierter Zellen des Entoderms (wozu auch die ins Ektoderm gewanderten Nematocyten zählen) zurückzuführen.

Die Zunahme der Zellzahl spiegelt sich im Mitoseindex wieder (Abb.3), der zwischen 20 und 30 h in beiden Keimblättern drastisch sinkt und im Ektoderm ab 50 h bei Null liegt. Die einzigen Zellen, die ab 50 h noch Mitosefiguren aufweisen, sind I-Zellen im Entoderm.

Alter (h)	ZZ aus Mazeraten	ZZ aus Schnitten:		
		Gesamt	Entoderm	Ektoderm
6	75			
6.5	200			
8	171			
12	600 $\pm$ 200			
15		2030 $\pm$ 500		
20		4250 $\pm$ 330		
24	2500 $\pm$ 100			
30	6300 $\pm$ 1900	8640 $\pm$ 1640	2370 $\pm$ 540	6270 $\pm$ 1550
35	6220 $\pm$ 1700			
50	10100 $\pm$ 2500	9360 $\pm$ 1300	1990 $\pm$ 640	7370 $\pm$ 1130
60	8150 $\pm$ 1000			
80		12940 $\pm$ 1100	3000 $\pm$ 700	9940 $\pm$ 850
100	10500 $\pm$ 2000	8290 $\pm$ 2200		
200		10900 $\pm$ 2500	2850 $\pm$ 650	8050 $\pm$ 2400

Tab.1: Zellzahlen (ZZ) aus Mazerationen und Schnitten in Larven verschiedener Altersstufen; pro Altersstufe wurden die Zellzahlen aus 3-10 Mazerationen (je 20-40 Larven gemeinsam mazeriert) bzw. Schnitten von je 3-12 Larven ermittelt.

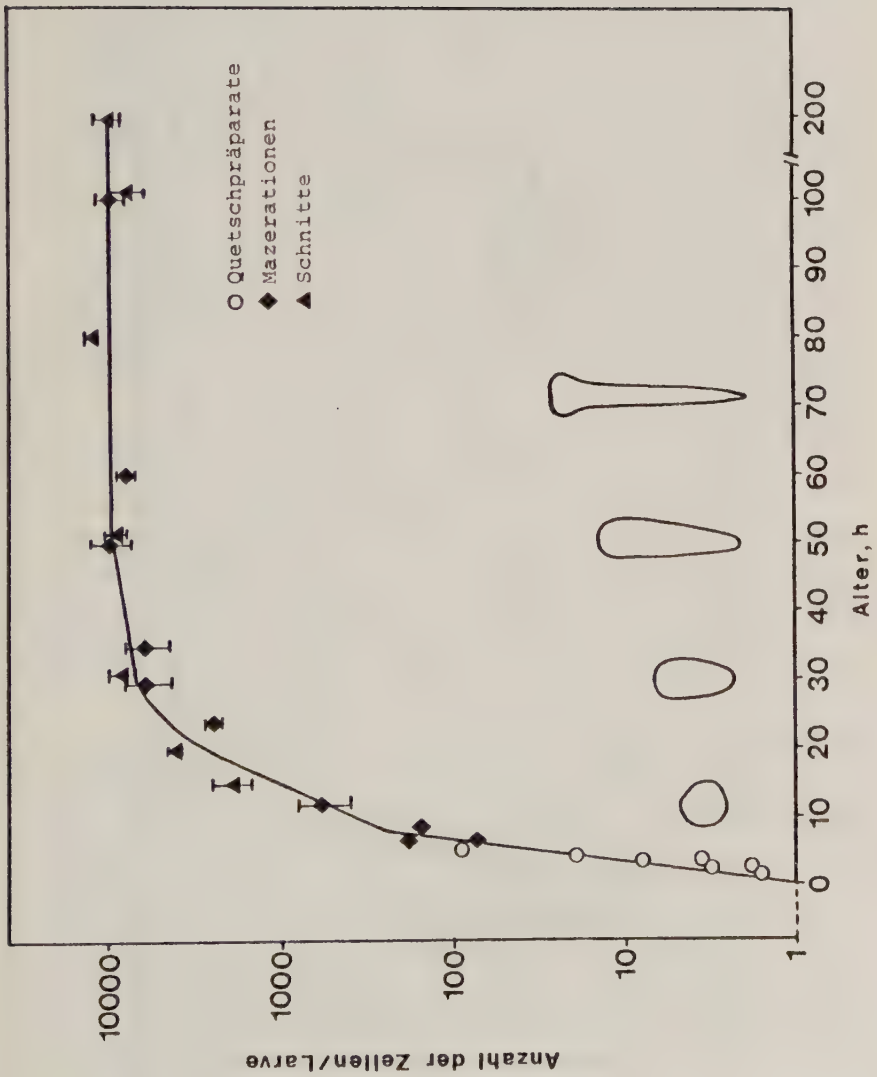


Abb. 2: Gesamtzellzahlen während der Embryonalentwicklung.

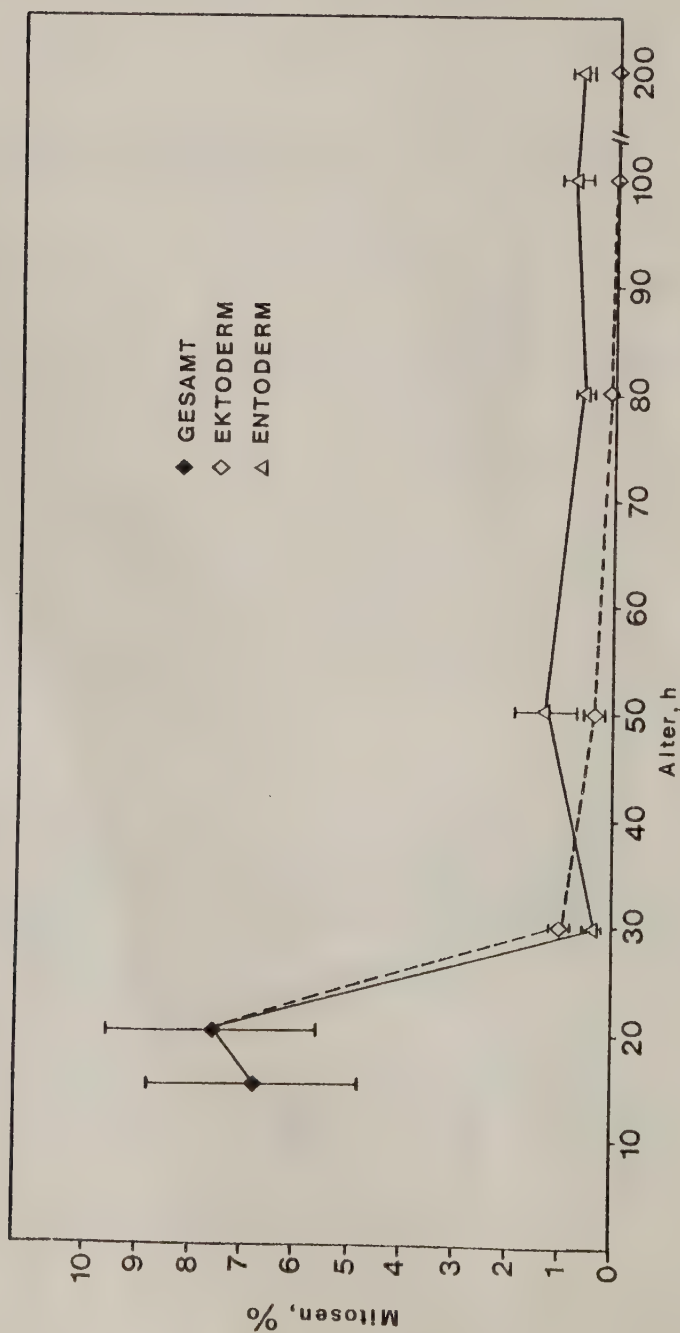


Abb. 3: Mitoseindex bei Larvenstadien verschiedenen Alters.

3.1.4. Ergebnisse der Mazeration

Zur Ergänzung der Zellzahldaten, die im vorigen Abschnitt geschildert wurden, und der zytologischen Untersuchungen wurden neben histologischen Schnitten auch Mazerationen angefertigt. In Anlehnung an die Mazeration von Hydragewebe (David, 1972) und von verschiedenen marinen Coelenteraten (Schmid et al., 1981) wurde eine Methode entwickelt, mit deren Hilfe man eine Suspension von vorwiegend einzelnen fixierten Zellen erhält. Dabei bleibt die Gestalt und die Morphologie der Zellen einschließlich vorhandenen Zellfortsätzen relativ gut erhalten und die Zellen können im Phasenkontrast betrachtet und charakterisiert werden. Bei *Hydractinia* führte die Anwendung der für andere Coelenteraten gebräuchlichen Methoden der Mazeration mit Essigsäure und/oder Hitze nicht zum Erfolg. Die Larve ist vor allem ab dem Präplanulastadium von einer zähen Schleimhülle umgeben, deren Zusammensetzung nicht bekannt ist. Wahrscheinlich ist sie der Grund für die Resistenz gegen die genannten Mazerationsmethoden. Ein relativ gutes Mazerationsergebnis konnte mit Ca-freiem Seewasser und einer enzymatischen Behandlung mit Cellulase, welche allerdings als Verunreinigung Fremdaktivitäten von Protease, Amylase und Pectinase enthält, in Kombination mit Essigsäure und Hitze erzielt werden. Durch Zugabe von Glycerin werden fragile Strukturen stabilisiert.

In Mazerationen kann bis 35 h lediglich zwischen verschieden großen Zellen unterschieden werden, wobei von rund bis oval in verschiedenen Größen alle Übergangsstufen vorhanden sind, so daß eine Erkennung distinkter Populationen innerhalb dieser Zellen nicht möglich ist. Auffällig ist die Anwesenheit von ungewöhnlich geformten Zellen in Mazerationen von 30 und 35 h alten Präplanulae: die rundlichen Zellen besitzen ein relativ großes zytoplasmatisches Anhängsel, das durch eine dünne Brücke mit dem kernhaltigen Teil der Zelle verbunden ist (Abb.4a).

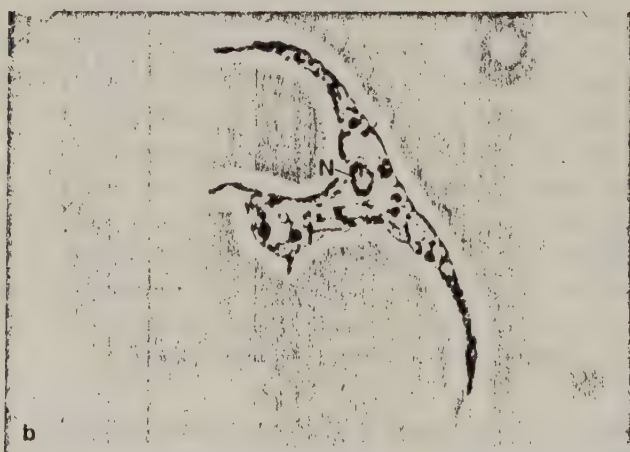


Abb. 4: Zellen aus Mazerationspräparaten verschiedener Larvenstadien

a. 30h-Larven: Ep = dotterreiche Epithelzelle
 A = kleine Zelle mit zytoplasmatischem Anhängsel

b. Epithelmuskelzelle einer 3 Tage alten Planula
 N = Zellkern

10 μ m

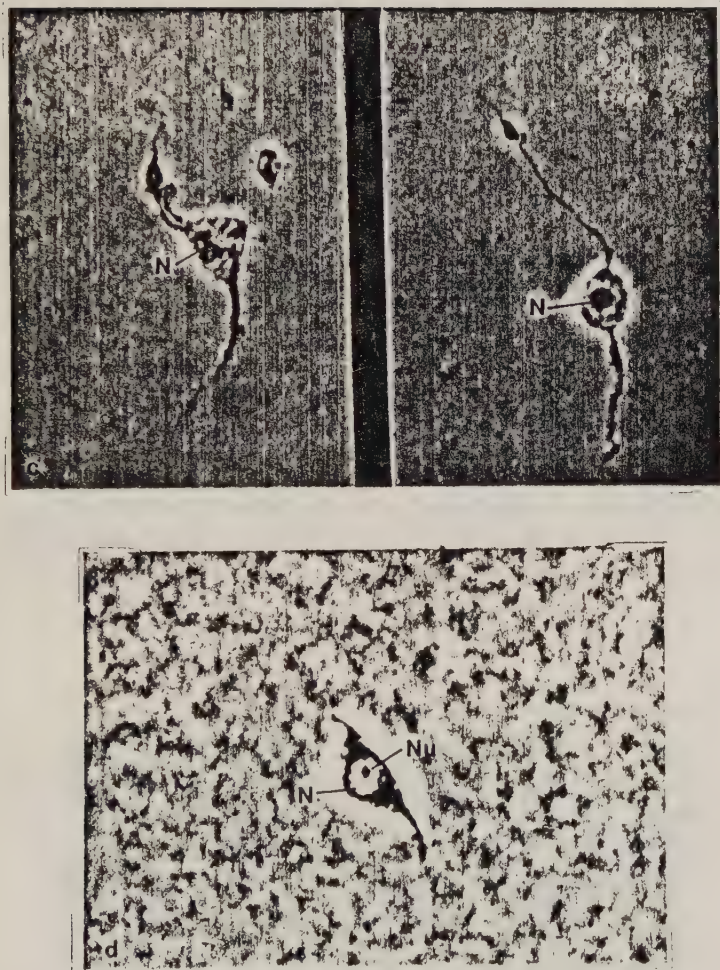


Abb.4 (Forts.):

- c. Nervenzellen bei 50 h alten Larven
N = Zellkern
- d. Interstitielle Zelle aus 3 Tage alter Planula
N = Zellkern
Nu = Nukleolus

10µm

Daß es sich hier nicht um telophasische Zellen handelt, die sich noch nicht vollständig voneinander getrennt haben, wurde durch eine spezifische DNA-Färbung mit DAPI nachgewiesen: nur ein Teil - der größere - enthält einen Zellkern. Ferner lassen sich in dieser Altersstufe bereits Zellen erkennen, die Nesselkapselvakuolen enthalten. Das Vorhandensein differenzierter Zellpopulationen ab 50-60 h wurde durch die Ergebnisse der Mazeration bestätigt bzw. ergänzt. Es gibt eine sehr große Zahl länglicher, z.T. sehr schmaler Zellen, die sicherlich einen großen Teil der ektodermalen Epithelzellen repräsentieren. Fast alle diese Zellen tragen mehr oder weniger lange Fortsätze. Außerdem lassen sich typische große Epithelmuskelzellen, die an ihrer Basis lange Fortsätze besitzen (mit diesen sind sie in der Mesogloea verankert) darstellen (Abb.4b). Darüber hinaus enthalten die Präparate eine große Zahl nicht bestimmbarer rundlicher und ovaler Zellen. Ab 50 h sind ferner als Nervenzellen identifizierbare Zellen vorhanden (Abb.4c). Typische I-Zellen mit prominentem Nukleolus (Abb.4d) wurden erst in Mazerationen von mindestens 60 h alten Larven gefunden.

3.1.5. Frühentwicklung bis zur Präplanula

Die jüngsten Stadien, an denen Semidünnschnitte durchgeführt wurden, waren 8 h alt (Abb.5). Zu diesem Zeitpunkt bestehen die Embryonen aus einem soliden Haufen morphologisch gleichartiger Blastomeren unterschiedlicher Größe. Eine epitheliale Zellschicht läßt sich noch nicht erkennen. Das Zytoplasma ist homogen gefärbt, der Dotter, der das Zytoplasma der Blastomeren ausfüllt, ist gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Die Größe der Blastomeren geht von 15 bis 35 μm , die Größenunterschiede erscheinen zufällig verteilt. Die Schnitte durch die verschiedenen Ebenen weisen weder zu diesem Zeitpunkt noch später einen Hohlraum auf. Die Zellkerne, von denen sich viele in der Mitose befinden, sind relativ groß (Durchmesser 7-10 μm) und der Kondensationszustand der Chromosomen läßt sich gut erkennen (Abb.6). Die Orientierung der Mitosefiguren weist keine

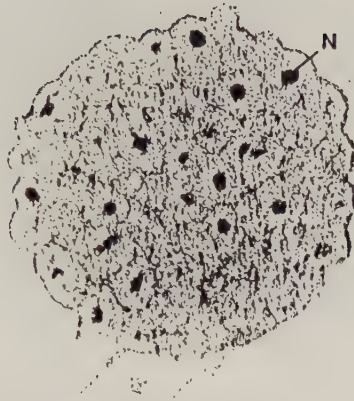


Abb. 5: 8 h alter Embryo, Semidünnschnitt 2 μ m, Toluidinblau
 N = Zellkern
 100 μ m

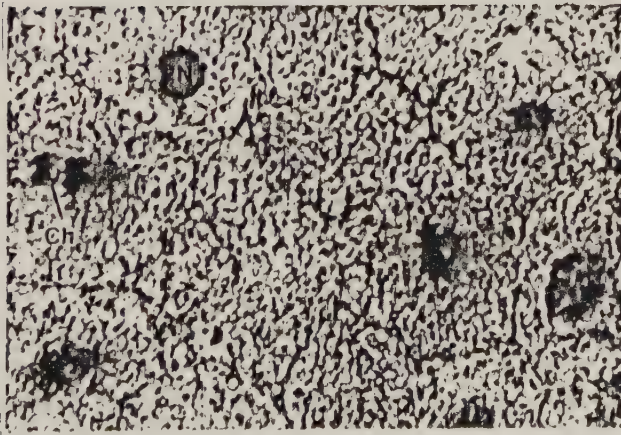


Abb. 6: Ausschnitt aus 8h-Embryo (s. Abb. 5)
 Blastomeren mit Kernen in Mitose
 Ch = kondensierte Chromosomen
 N = Zellkern in der Interphase
 10 μ m

bevorzugte Richtung auf. Sichtbare Nukleoli sind nicht vorhanden.

Die Schnittpräparate zeigen, daß die Gastrulation bei *Hydractinia* zwischen 8 und 15 h einsetzt. Nach Siewing (1969) wird als Gastrulation der Prozeß bezeichnet, durch den das zweite Keimblatt, das Entoderm, gebildet wird. Im Alter von 15 h ist bereits eine Sonderung in zwei verschiedene Zellagen vorhanden (Abb.7). Der Keim besteht hier aus ca. 2000 Zellen.

Die äußere Zellschicht besteht aus hohen schmalen Zellen. Ihr Zytoplasma weist bereits die für alle darauffolgenden Stadien typische Aufteilung in einen fein granulären peripheren Teil und einen mit großen Dotterkugeln gefüllten basalen Teil auf.

Die inneren Zellen sind eher rundlich. Sie sind dicht gefüllt mit großen Dotterkugeln. Die meisten Zellkerne sind etwa 6-10 μm groß und besitzen mehrere Kernkörperchen. Etwa die Hälfte der inneren Zellen enthält neben den großen Dotterkugeln eine sehr fein granuläre, homogen hellblau gefärbte Masse, wobei diese Masse stets in unmittelbarer Nachbarschaft des Zellkerns lokalisiert ist (Abb.8).

Vereinzelte wurden im Inneren kleine Zellen mit relativ kleinen, kompakten Kernen und wenig Dotter gesehen (Abb.9), die als frühe Stadien von I-Zellen (sog. Prä-I-Zellen) betrachtet werden. Ab 15 h wird der bis dahin runde Embryo zunehmend ovaler.

In 20 h Schnitten beginnt sich eine Trennung der beiden Keimblätter durch die Mesoglea, die stellenweise als dünne Lamelle zu sehen ist, abzuzeichnen (Abb.10). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Polarität der Larven erkennbar ist, kann man nicht beurteilen, ob ihre Ausbildung bevorzugt an einem bestimmten Ort beginnt. Die Beobachtung, daß sie jedoch bei älteren Präplanulastadien am anterioren Pol stets dicker ist, könnte ein Hinweis darauf sein, daß ihre Bildung von dort ausgeht.

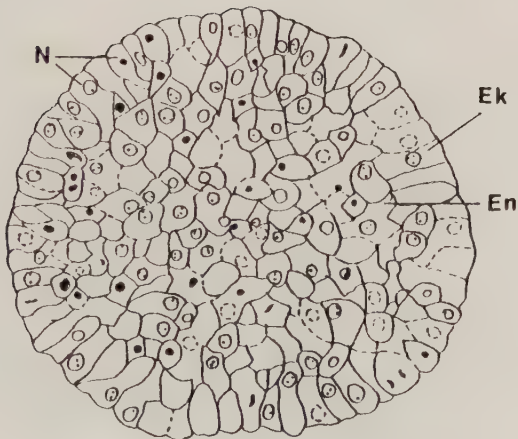
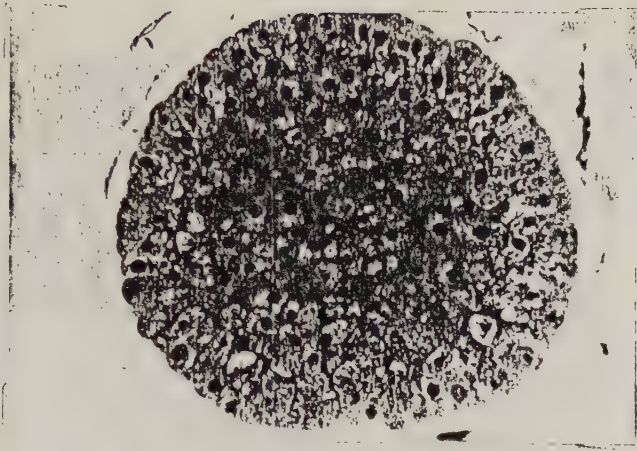


Abb.7: 15 h alter Embryo, Semidünnschnitt 2 μ m, Toluidinblau

En = Entoderm

Ek = Ektoderm

N = Zellkern

50 μ m

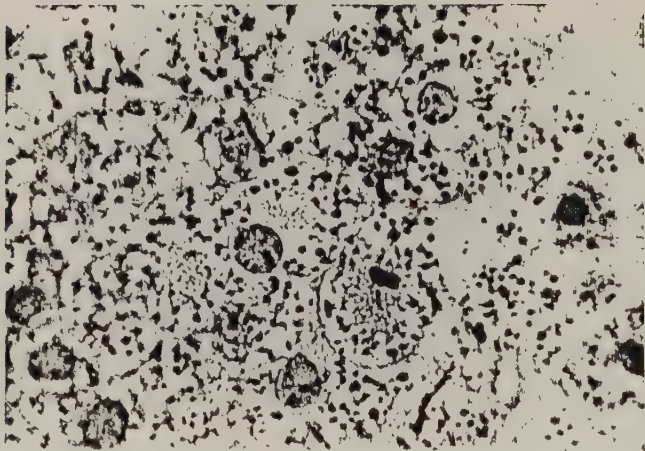


Abb.8: Ausschnitt aus dem Entoderm eines 15h-Embryos

D = Dottergranula

N = Zellkern

Nu= Nukleolus

G = feingranulärer Zytoplasmabereich (s.s.35)

M = Mitose

Semidünnschnitt 2 μm , Toluidinblau

10 μm

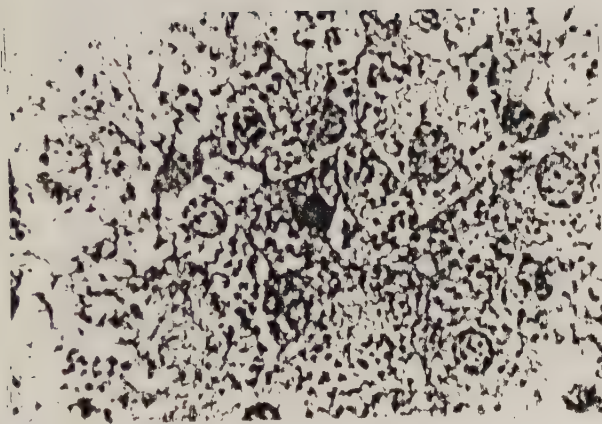


Abb. 9: Ausschnitt aus dem Entoderm eines 15h-Embryo. In der Mitte befindet sich eine Prä-I-Zelle (IZ) mit kleinerem, stärker kondensiertem Kern (N) und basophilem Zytoplasma (Z).

Semidünnschnitt 2 μm , Toluidinblau

10 μm

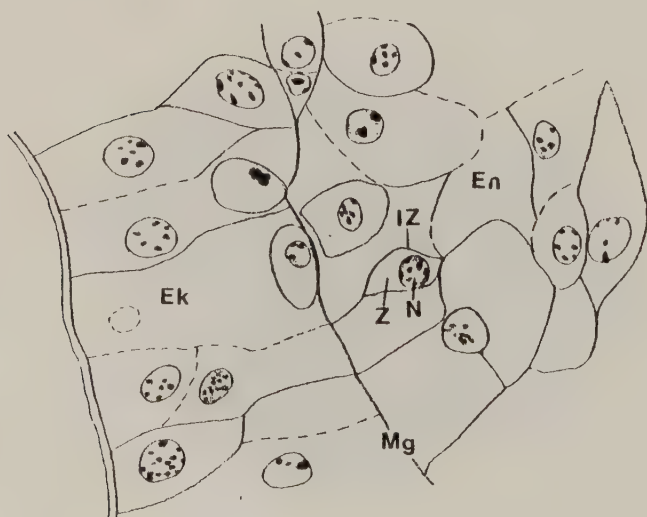
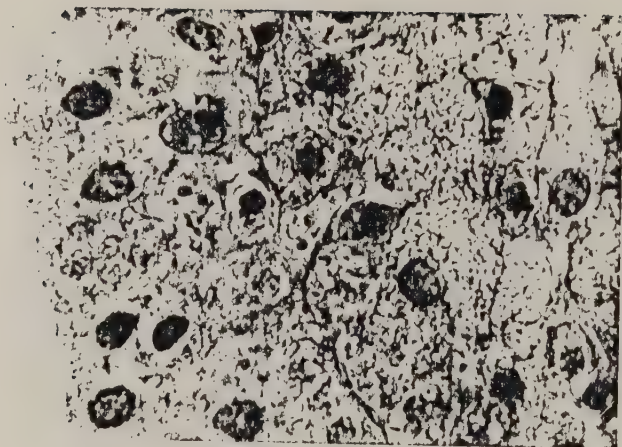


Abb.10: Ausschnitt aus dem Ektoderm/Entoderm einer 20 h alten Larve. Im Entoderm befindet sich eine Prä-I-Zelle (IZ), mit kleinem, kondensiertem Kern und dotterfreiem, basophillem Zytoplasma. N = Zellkern, Z = Zytoplasma. Die Mesogloea ist an einigen Stellen in der Bildung. Mg = Mesogloea, En = Entoderm, Ek = Ektoderm

Semidünnschnitt 2 μ m, Toluidinblau

10 μ m

Die Zellzusammensetzung dieses Stadiums ist ähnlich wie bei 15h-Stadien, die quantitativen Verhältnisse haben sich jedoch verändert. Die Gesamtzellzahl hat sich verdoppelt. Die Menge der in Abb.8 dargestellten Zellen hat erheblich abgenommen, während die Anzahl der kleinen dotterarmen Zellen mit kompaktem Kern zugenommen hat (Abb.10).

3.1.6. Zelluläre Organisation der Larve

Bis zum Präplanulastadium läßt sich an der Larve keine Polarität erkennen. Das Ektoderm besteht im Wesentlichen aus einer Schicht länglicher Epithelzellen, an deren Basis jedoch häufig zusätzlich rundliche Zellen liegen. Das Entoderm wird durch eine Masse polygonaler Zellen ohne besondere räumliche Organisation gebildet.

Ab etwa 25 h wird die Polarität der Larve sichtbar: Das zukünftige anteriore Ende ist gegenüber dem posterioren Ende verbreitert. Die typische Organisation des Planula-Entoderms zeichnet sich bereits während des Präplanulastadiums ab: die Peripherie ist dicht mit Zellkernen besetzt, während das Zentrum durch dotterhaltiges Zytoplasma und eine geringe Kerndichte charakterisiert ist.

Die Zellen des Planula-Ektoderms sind lang und schmal, ihr Kern ist rund ($3.1 \times 3.1 \mu\text{m}$) oder häufig leicht länglich ($2.0\text{--}3.1 \mu\text{m} \times 4.1\text{--}5.1 \mu\text{m}$). Die räumliche Anordnung der Entodermzellen ist bei der Planula deutlich ausgeprägt (Abb.11). Der anteriore, breiteste Abschnitt besteht fast ausschließlich aus großlumigen, dotterhaltigen "normalen" Entodermzellen. Im Anschluß daran kommt eine Zone, in der zwischen den normalen Entodermzellen große Mengen von I-Zellen und Nematoblasten liegen. Im sich verjüngenden posterioren Abschnitt des Entoderms befinden sich immer noch, allerdings in abnehmender Dichte, I-Zellen und Nematoblasten. Im Zentrum des Entoderms sieht man keine Zellkerne, es ist ausgefüllt von dotterhaltigem Zytoplasma. Diese Dotterzellen wirken zwar mit zunehmendem Alter der Planula immer vakuloenreicher und fragiler, es konnte aber bei den Semidünnschnitten kein Hohlraum festgestellt werden.

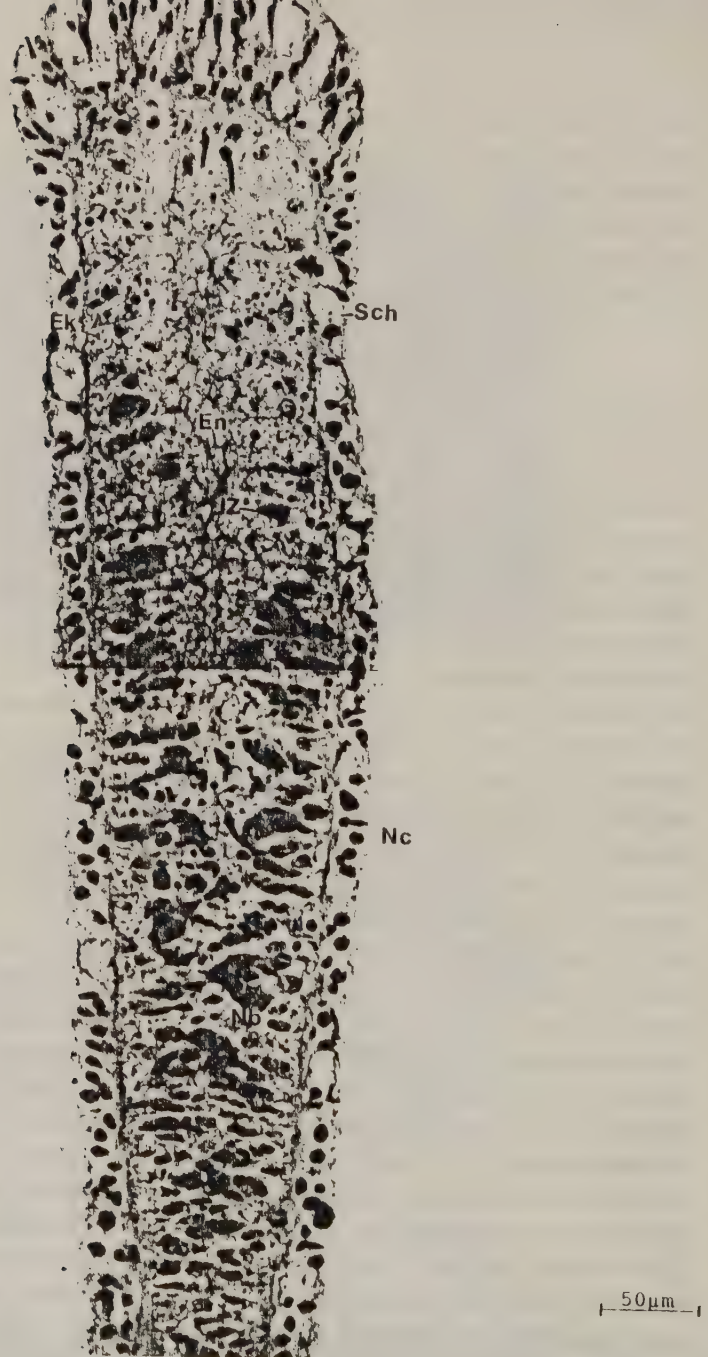


Abb. 11: Längsschnitt einer ausgewachsenen Planula (6 Tage). Im Bild sind die vorderen 2/3 der gesamten Planula, der anteriore Pol zeigt nach oben. Der anteriore Teil des Entoderms ist fast frei von den basophilen I-Zellen (IZ) und Nematoblasten (Nb). Sch = Schleimzellen, En = Entoderm Ek = Ektoderm, Nk = Nesselkapseln der Nematocyten Semidünnschnitt 2 μ m. Azur-Eosin-Methylenblau

3.1.7. Stadien der Planulaentwicklung unter Berücksichtigung einzelner Zelltypen

3.1.7.1. Die Entwicklung der interstitiellen Zellen

Die I-Zellen, die wie bei den meisten Coelenteraten (Überblick dazu Tardent, 1978) auch bei *Hydractinia* als multipotente embryonale Reservezellen vorhanden sind (Müller 1964, 1967), werden während der Embryonalentwicklung gebildet. Sie werden anhand morphologischer Kriterien charakterisiert. Ihre Gestalt ist spindelförmig-oval, ihr Kern ist rund mit deutlich hervortretenden Nukleoli und füllt einen großen Teil der Zelle aus, so daß am Rand z.T. nur ein schmaler Zytoplasmasaum zu sehen ist. Ein wichtiges Merkmal ist die Basophilie des Zytoplasmas, die auf Reichtum an RNS hinweist. Typische I-Zellen aus älteren Larven, deren Morphologie den aus adulten Cnidaria bekannten I-Zellen entspricht, sind in den Abb. 4d und 12 gezeigt.

Die Identifizierung von eventuell vorhandenen I-Zellen ist gerade bei frühen embryonalen Stadien von *Hydractinia* schwierig, da viele Zellen basophiles Zytoplasma besitzen und bei fast allen Zellkernen spätestens ab 15 h ausgeprägte Kernkörperchen vorhanden sind.

Bereits vor Bildung der Mesogloea findet man Zellen - bei Stadien von 15 h vereinzelt und bei 20 h etwa 100 Zellen pro Larve -, die frühe Stadien von I-Zellen sein könnten (Abb. 9 und 10). Im zukünftigen Entoderm gibt es einige wenige, im Vergleich zu den anderen relativ kleine Zellen (etwa 5-7 μm groß), deren Zytoplasma wenig bis keinen Dotter enthält, jedoch im Vergleich zu den übrigen Zellen etwas basophiler ist.

In Paraffinschnitten von 25 h alten Larven sind im Entoderm deutlich spindel- bis tropfenförmige Zellen zu sehen, deren Zytoplasma mit Toluidinblau stärker angefärbt ist als die übrigen Zellen (Abb. 13). Durch die bei Fixierung und Einbettung aufgetretene leichte Schrumpfung des Gewebes treten diese Zellen besser hervor als bei Semidünnschnitten von ähnlich alten Stadien und wurden deshalb als I-Zellen oder zumindest diesem Zelltyp sehr ähnliche Zellen erkannt.

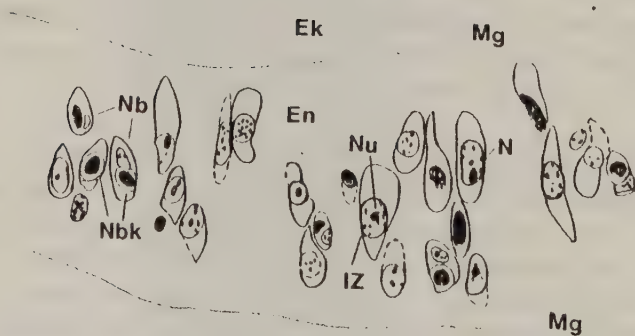
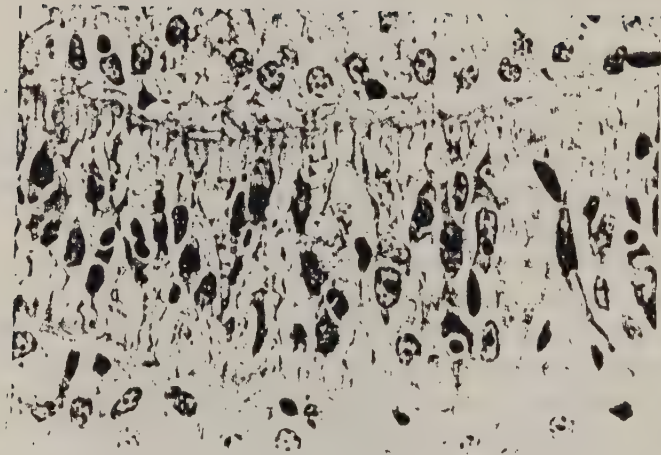


Abb. 12: Ausschnitt aus einem Längsschnitt durch eine 5 Tage alte Planula. In der Bildmitte befindet sich das Entoderm (En), das I-Zellen (IZ) und Nematoblasten (Nb) enthält.

Ek = Ektoderm, Mg = Mesogloea, NbK = Nesselkapsel in der Entwicklung, N = Zellkern, Nu = Nukleolus

10 μ m

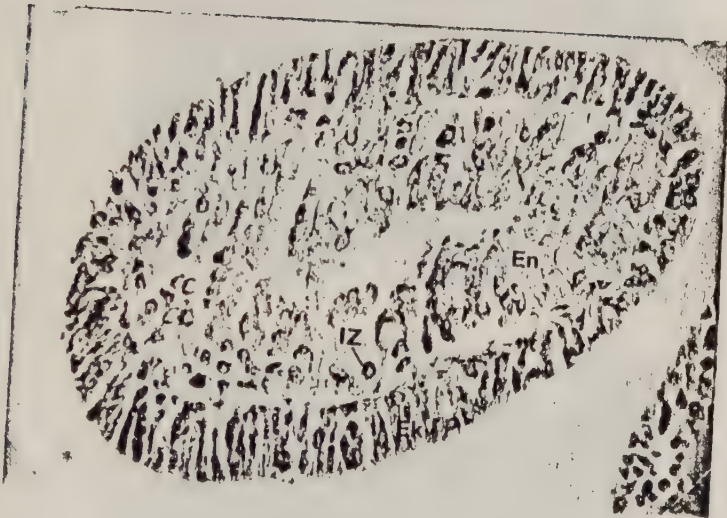


Abb.13: Längsschnitt einer 25 h alten Larve.
Im Entoderm (En) treten basophile frühe I-Zellen (IZ)
deutlich hervor.

Ek = Ektoderm

Paraffinschnitt 5 μ m, Toluidinblau

100 μ m

Ihre Anzahl beträgt bei 28 h ungefähr 200.

Die ultrastrukturelle Untersuchung von 25 und 30 h alten Larven ließ ebenfalls neben großen dotterhaltigen Entodermzellen (Abb.14b) kleine, dotterfreie Zellen erkennen (Abb.14c).

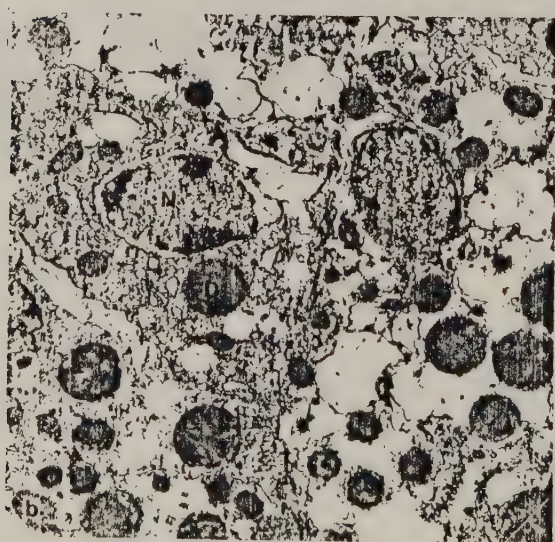
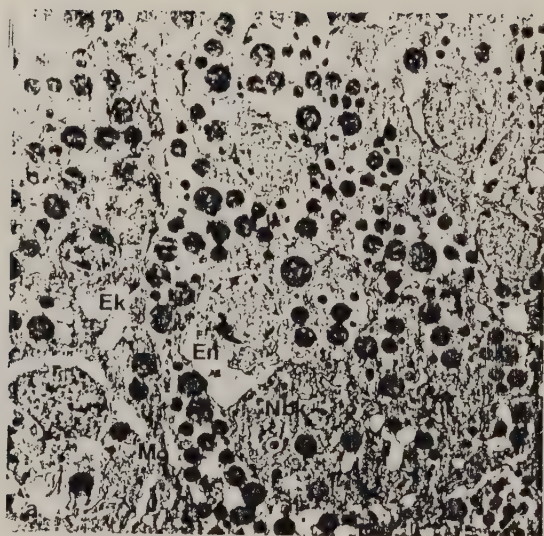


Abb.14: Elektronenmikroskopische Präparate einer 30 h alten Larve.

a. Ausschnitt aus Ektoderm (Ek) und Entoderm (En); im Entoderm befinden sich einige sehr frühe Nematoblastenstadien mit Nesselkapseln in der Entwicklung (Nbk)
 N = Zellkern, Mg = Mesogloea 10 μm

b. Entodermale Epithelzelle mit Dottergranula (D)
5 μm

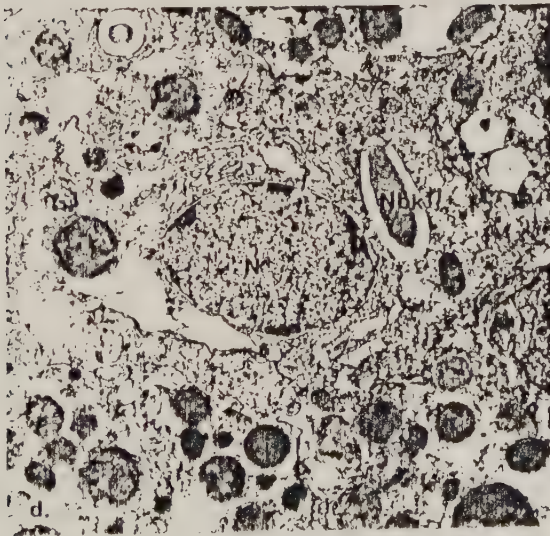
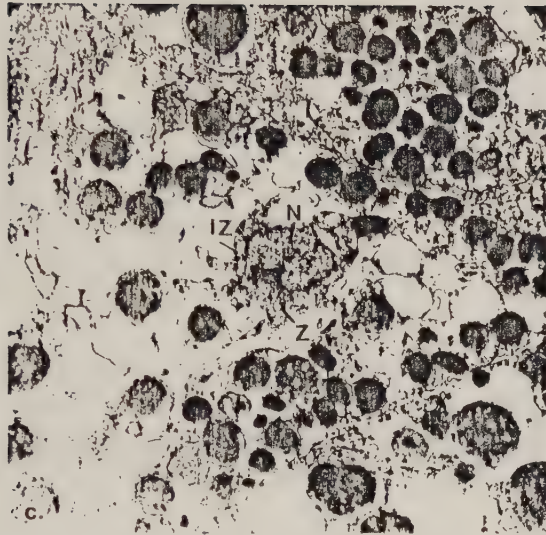


Abb. 14 (Forts.):

c. Ausschnitt aus dem Entoderm mit früher I-Zelle (IZ), deren schmaler Zytoplasmasaum keine Dottergranula enthält. Z = Zytoplasma der I-Zelle

d. Ausschnitt aus dem Entoderm (s. Abb. 14a) mit jungem Nematoblastenstadium (Nb).

N = Zellkern des Nematoblasten, 5µm

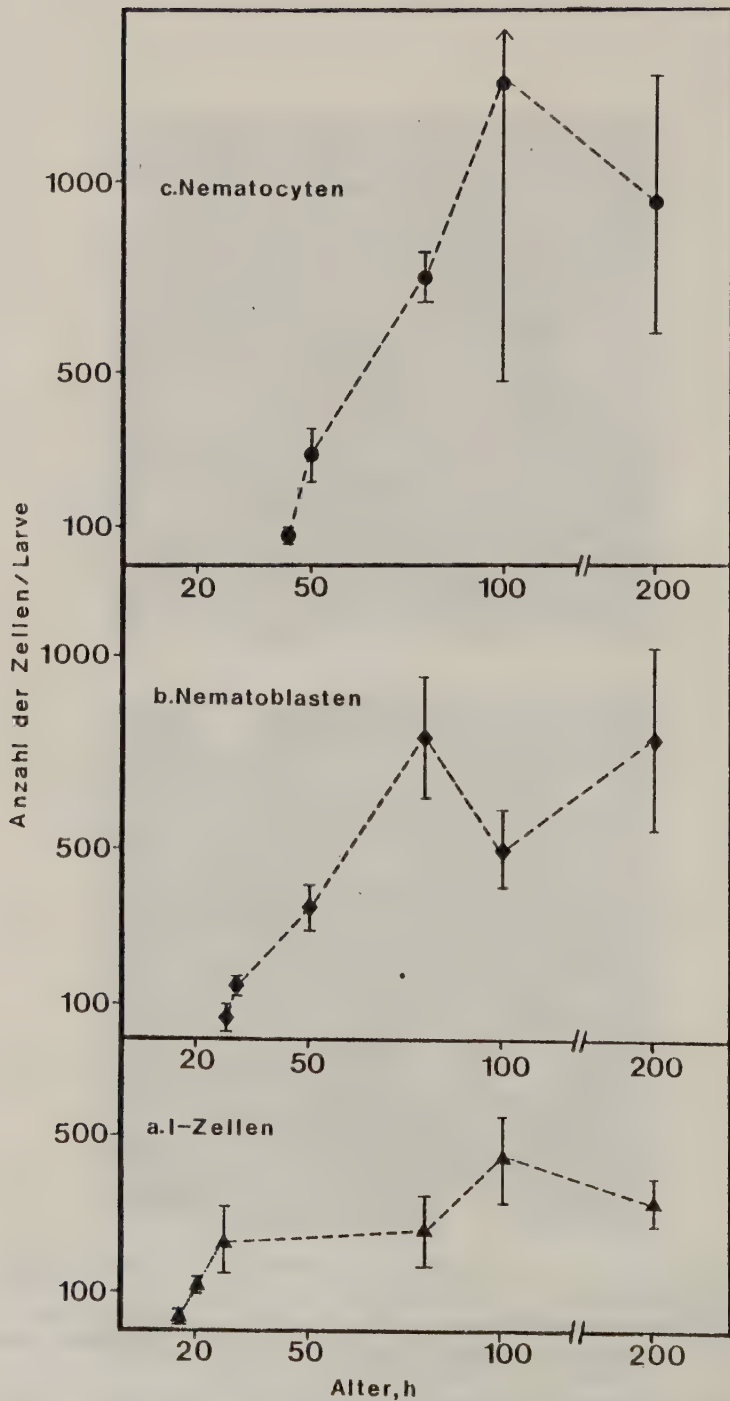


Abb. 15: Kinetik der Entwicklung von I-Zellen (a), Nematoblasten (b) und Nematocyten (c).

Erst in älteren Planulae (ab etwa 60 h) ist der typische I-Zell Charakter ausgeprägt und die Zellen sind relativ leicht sowohl im Semidünnschnitt als auch in Mazerationen erkennbar (Abb.12 und 1d).

Die Gesamtzahl der I-Zellen wächst mit zunehmendem Alter auf ca. 400 Zellen/Planula (Abb.15a). Es werden jedoch immer in Mitose befindliche I-Zellen gefunden. Dies bedeutet, daß diese Zellpopulation ständig proliferiert. Die gleichzeitig zunehmende Zahl von Nematoblasten und Nematocyten legt nahe, daß diese - wie auch bei Adulten - Abkömmlinge der proliferierenden I-Zellen sind.

Im Gegensatz zum adulten Tier befinden sich bei der Planula die I-Zellen nur im Entoderm. Die dort vorhandene Zonierung, die sich bereits bei der Präplanula erkennen läßt, wurde im vorigen Abschnitt schon beschrieben.

Bei mehrere Tage alten Planulae treten gelegentlich einzelne I-Zellen im Ektoderm, meist im anterioren Bereich, auf. Während der Metamorphose findet dann eine massenhafte Auswanderung ins Ektoderm statt (van de Vyver, 1964). Toluidinblau gefärbte Totalpräparate von Primärpolypen zeigen, daß das basale Ektoderm dann ebenso wie die von dort auswachsenden Stolonen sehr dicht mit I-Zellen besetzt ist. In den Stolonen der Primärpolypen befinden sich die I-Zellen in einer typischen Anordnung: Sie sind im Ektoderm lateral aufgereiht, während sie im "Dach" des Stolo bloß vereinzelt vorkommen.

Ob I-Zellen und Nematoblasten in echten Nestern wie z.B. bei Hydra (Campbell and David, 1974) auftreten, kann anhand der vorliegenden Daten nicht gesagt werden. In den Schnitten sind häufig Pärchen von I-Zellen sowie größere Gruppen von I-Zellen und Nematoblasten zu sehen, in Mazeraten wurden jedoch keine zusammenhängenden Nester gefunden. Eine Entscheidung darüber kann allerdings nur der ultrastrukturelle Nachweis von Zytoplasmabrücken bringen (Slautterback and Fawcett, 1959).

3.1.7.2. Entstehung von Nematoblasten und Nematocyten

Die Nesselzellen der Cnidaria, die Nematocyten, sind Differenzierungsprodukte von I-Zellen. Ihre Entstehung aus I-Zellen über Nematoblasten ist bei adulten Cnidaria in einigen Arbeiten untersucht worden (z.B. Slautterback and Fawcett, 1959; Lentz, 1965a; Holstein, 1981) und beginnt bereits während der Embryonalentwicklung (z.B. Weiler-Stolt, 1960).

Bei *Hydractinia* treten die ersten Nematoblasten einige Stunden nach der Gastrulation im Entoderm auf. Zu diesem Zeitpunkt sind die noch kleinen Kapseln homogen hell gefärbt. Es handelt sich ausschließlich um ziemlich frühe Entwicklungsstadien. Das Vorhandensein junger Nesselkapselprimordien konnte in Ultradünnschnitten von 25 und 30 h Stadien bestätigt werden (Abb.14a und d).

Bei älteren Larven hingegen ist das gesamte Spektrum von Reifungsstadien vertreten. Mit zunehmender Reifung werden die Kapseln immer größer und dunkler, ausgereifte Kapseln sind bei Färbung mit Azur-Eosin-Methylenblau schließlich tief rotviolett gefärbt.

Jüngere Nematoblasten sind von I-Zellen nur durch den Besitz der Kapselbildungsvakuole unterscheidbar. Letztere war beim Auszählen von I-Zellen und jüngeren Nematoblasten das einzige Unterscheidungsmerkmal. Der Zellkern jüngerer Nematoblasten ist ebenso groß und rund, das restliche Zytoplasma intensiv blau gefärbt. Erst mit zunehmender Differenzierung wird der Zellkern kompakter und schmiegt sich schließlich mondsichelförmig an die wachsende Kapsel an. Das Zytoplasma ist dann bis auf einen schmalen Saum verdrängt.

Im Alter von 28 h wurde eine Anzahl von rund 80 Nematoblasten pro Tier ermittelt. Die Zahl nimmt ständig zu, die Planula besitzt zum Zeitpunkt der Metamorphose 500-800 Nematoblasten. Bei mehrere Tage alten Planulae trifft man sehr vereinzelt auf Nematoblasten im Ektoderm.

Im Alter von 50 h ist bereits eine größere Zahl von

Nematoblasten zu Nematocyten ausdifferenziert. Die Nematocyten sind vorwiegend im Ektoderm, jedoch findet man vor allem bei mehrere Tage alten Stadien mit sehr vielen Nematocyten (teilweise 1500-2500 Nematocyten pro Tier) einen Anteil von 30-50 % dieser Nesselzellen im Entoderm. Die Anzahl der Nematocyten übersteigt bei ausgereiften Planulae die der Nematoblasten.

Die Kinetik der Nematocytendifferenzierung ist in Abb.15b und c dargestellt.

3.1.7.3. Nesselzelltypen der Planula

Das Cnidom der Larven setzt sich aus drei verschiedenen Typen zusammen. Mit einer Länge von 3.6-3.8 μm und einer Breite von 1.9-2.2 μm sind die Desmonemen die kleinsten Nematocyten. Ein weiterer Typ wurde nach der Nomenklatur von Werner (1965) als mikrobasische Eurytelen bestimmt, die in ziemlich variablen Dimensionen vorhanden waren: sie sind etwa 2.5-3.5 μm breit; ihre Länge variiert, in Planulae erreichen sie 6.7-8.3 μm , in Stolonen von Primärpolypen bis 9.6 μm . Desmonemen und mikrobasische Eurytelen, die auch in adulten Polypen vorhanden sind (Abb.16), wurden bereits von Weill (1934) als die einzigen bei *Hydractinia* auftretenden Nesselzelltypen beschrieben. Mikrobasische Eurytelen werden jedoch bei Planulae nicht so groß wie bei Adulten.

Ein dritter, bisher nirgendwo erwähnter Nesselzellentyp kam bei Planulae in geringer Zahl, in den Stolonen der Primärpolypen allerdings sehr häufig vor. Seine Kapseln sind auffällig lang und dünn (1.2-1.5 μm breit und 8-9 μm lang), manchmal leicht gebogen und besitzen an einem Ende einen kleinen, knopfartigen Deckel. Da diese Kapseln niemals in entladenen Zustand gefunden wurden und auch im Schnitt keine innere Struktur erkennen lassen, konnte der Typ nicht näher bestimmt werden.

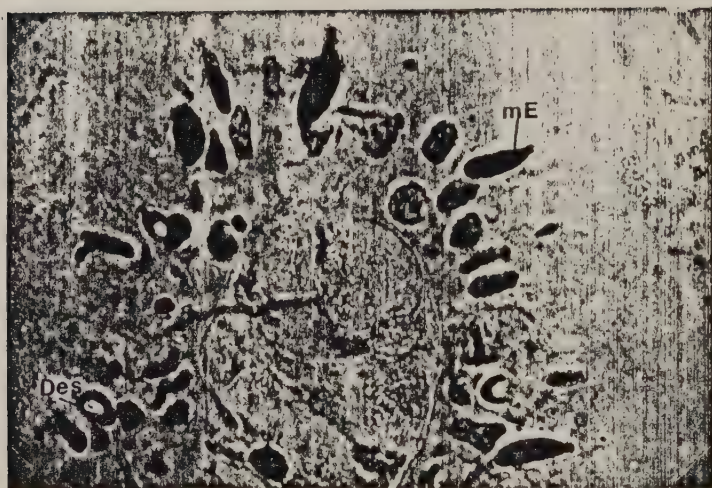


Abb.16: Desmonemen (Des) und mikrobasische Eurytelen (mE) in der Tentakelspitze eines Gastrozooids.
Semidünnschnitt 2 μ m, Azur-Eosin-Methylenblau

10 μ m



Abb.17: Anteriores Ektoderm (Ek) und Entoderm (En) einer 8 Tage alten Planula. Das Ektoderm ist dicht besetzt mit Schleimzellen (Sch); im Entoderm befinden sich lange, dünne Nesselkapseln (Nk).

10 μ m

Fertige Desmonemen und mikrobasische Eurytelen erscheinen bei 44 h zum ersten Mal in geringer Zahl im Ektoderm. Der dritte, unbekannte Typ wird erst bei mindestens drei Tage alten Larven angetroffen und befindet sich überwiegend im anterioren Teil (Abb.17), aus dem nach der Metamorphose die Stolonien hervorgehen.

3.1.7.4. Nervenzellen

Mit Hilfe der Mazerationstechnik konnte das Vorhandensein von Nervenzellen bereits bei der Planula nachgewiesen werden.

Im Alter von 50 h wurden etwa 100-150 Nervenzellen pro Planula ermittelt. Der Zellkörper der Nervenzellen ist mit 3-5 µm relativ klein. Die Nervenzellen besitzen meist 2-3 Fortsätze (Abb.1c).

3.1.7.5. Schleimzellen

Im Alter von 2 Tagen sind im Ektoderm der Planula zahlreiche Schleimzellen vorhanden. Der kleine, kompakte Kern befindet sich an der Basis der Zelle, nahe der Mesogloea, das Zytoplasma erscheint hohl und großlumig. Bei älteren Planulae ist vor allem das anteriore Ende von Schleimzellen dicht besetzt (Abb.17). Die Schleimzellen sind auf die Embryonalentwicklung beschränkt und spielen vermutlich während der Metamorphose beim Festsetzen auf das Substrat eine Rolle (Weis et al., 1985).

3.2. Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen Hydractinia I-Zellen: Untersuchungen des Antigens in verschiedenen Entwicklungsstufen und verschiedenen Klonen von Hydractinia

3.2.1. Produktion monoklonaler Antikörper gegen I-Zellen

Da eine selektive Isolierung und Anreicherung einzelner Zelltypen bei Hydractinia bisher nicht möglich ist, wurden die Stolonen 2 Tage alter Primärpolypen zur Immunisierung verwendet, da diese eine relativ hohe Dichte der gewünschten immunogenen Zellen besitzen.

Nach der Fusion wurden die erhaltenen Klone wie bei "Methoden" beschrieben an PFA-fixierten Primärpolypen getestet und kloniert. Der entwickelte Test an Totalpräparaten in Mikrotiterplatten eignet sich gut für das Testen der Hybridomaüberstände. Die fixierten Primärpolypen können in den Platten in gewünschter Anzahl vorbereitet werden und dann können in einem Arbeitsgang auf kleinem Raum jeweils knapp hundert Überstände getestet werden. Die IIF an Totalpräparaten bietet einen guten Eindruck der dreidimensionalen Struktur des Gewebes und ermöglicht die Lokalisierung und eine teilweise Typisierung des Antigens, wie auch schon die Arbeiten von Grimmelikhuijzen (1985), Reuter et al. (1986) und andere gezeigt haben.

Unter ca. 600 Klonen befanden sich lediglich 4, die mit Hydractinia-Primärpolypen eine positive Antikörperreaktion zeigten. Bemerkenswert ist, daß zwei daraus resultierende Zelllinien, H4.59 und H6.31, dasselbe Bindungsmuster aufwiesen. Da H4.59 schneller wuchs als H6.31, wurden die meisten Antikörperfärbungen mit Überstand dieses Klons durchgeführt.

Im Laufe der Antikörperfärbungen stellte sich heraus, daß mehrere verschiedene Gewebetypen positiv mit dem Antikörperüberstand reagierten. Wiederholte Antikörperfärbungen nach Subklonierungen zeigten aber, daß diese Spezifität erhalten blieb, so daß man davon ausgehen konnte, daß alle Färbungen mit einem monoklonalen Antikörper durchgeführt worden waren. H6.31 wurde jedoch ebenfalls gezüchtet und wiederholte Antikörperfärbungen der Überstände

von Subklonen zeigten auch hier, daß das Bindungsmuster stabil blieb. Das Bindungsmuster des hier erhaltenen monoklonalen Antikörpers wird im folgenden beschrieben.

3.2.2. Eigenschaften des monoklonalen Antikörpers

Die Antikörperfärbung zeigt, daß der Antikörper an ein Zelloberflächenantigen von I-Zellen (z.B. Abb.19) bei verschiedenen Entwicklungsstadien von *Hydractinia* bindet. Bei adulten Polypen ist zudem eine spezifische Zelloberflächenfärbung von Nervenzellen einschließlich der Nervenfasern vorhanden (Abb.20). Untersuchungen an Schnittpräparaten zeigen zudem eine starke Färbung des Entoderms; hierbei werden zusätzlich zur Zelloberfläche das Zytoplasma und auch Zellzwischenräume gefärbt.



Abb.18: 2 Tage alter
Primärpolyp nach Anti-
körperfärbung:
I-Zellen des Rumpfs
und der Polypenbasis
zeigen eine positive
IIF. Am Hypostom ist
eine diffuse Fluores-
zenz. (Totalpräparat)
H = Hypostom, R = Rumpf
Pb = Polypenbasis,
St = Stolo

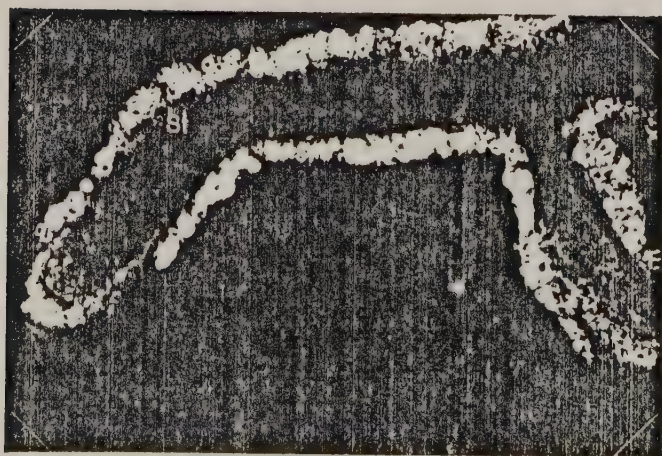


Abb.19: Stolonen eines 2 Tage alten Primärpolyp mit positiver
IIF der I-Zellen.
St = Stolo

3.2.2.1. Bindungsmuster bei Primärpolypen

Das Antikörperbindungsmuster bei Primärpolypen ist in Abb.18 und 19 gezeigt. Der Antikörper bindet hier an die Oberfläche von I-Zellen, die in Stolonen und in der Polypenbasis in großer Dichte vorhanden sind. Auch die im Rumpf der Primärpolypen verstreut liegenden I-Zellen sind positiv. Zusätzlich ist meistens eine diffuse, nicht mit bestimmten Zellen assoziierbare Färbung des oberen Teils des Hypostoms zu sehen.

3.2.2.2. Bindungsmuster bei adulten Polypen

Die Antikörperfärbung von Total-Präparaten adulter Gastrozooiden zeigt auch hier eine positive Reaktion der im Rumpfektoderm befindlichen I-Zellen (Abb.20 und 21). Wie mit Toluidinblau gefärbte Totalpräparate und Schnitte bestätigen, ist ihre Verteilung im Rumpf deutlich zoniert: Basal sind sie weniger dicht, in der Rumpfmittle befindet sich eine breite Bande, die sehr dicht mit I-Zellen besetzt ist und gegenüber dem oberen Rumpfbereich unterhalb des Hypostoms deutlich abgesetzt ist. In dieser "I-Zell-Zone" liegen die Zellen häufig als Gruppen, möglicherweise als Nester, zusammen (Abb.21). Im oberen Rumpfbereich befinden sich nur noch vereinzelt I-Zellen, und das Hypostom ist praktisch frei davon.

Ein weiterer, in adulten Polypen ebenfalls positiver Zelltyp sind Nervenzellen. Vor allem in den Bereichen, wo wenig I-Zellen vorhanden sind, sieht man positive Nervenzellen und sehr lange Fasern. Im oberen Rumpfteil ziehen die Fasern sowohl zum Hypostom als auch in die Tentakel, wo sie immer wieder mit neu anschließenden Zellen und Nervenfasern verschaltet sind.

Am Hypostom ist wie bei den Primärpolypen eine diffuse positive Färbung erkennbar.

Außerdem zeigen vor allem die Spitzen der Tentakel im Entoderm eine diffuse Färbung.

Eine Antikörperfärbung wurde auch an jungen Blastostylen ohne Gonophoren und an Blastostylen mit weiblichen Gonophoren durchgeführt. Die Ergebnisse sind ähnlich wie bei Gastrozoiden. Die hauptsächlich im mittleren bis oberen Teil des Rumpfektoderms (vor allem in der Gonophorensprossungszone) vorhandenen I-Zellen sind Antikörper-positiv, ebenso die Nervenzellen (Abb.22 und 23). Das Ektoderm der weiblichen Gonophoren enthält ein Nervennetz, das den Gonophor vollständig umspannt (Abb.23). Bei Blastostylen reagiert zudem ein weiterer Zelltyp mit dem Antikörper. Es handelt sich um entodermale Zellen an der Basis der Tentakuloide, deren Struktur im Fluoreszenzbild stark vakuolisiert aussieht (Abb.22).



Abb.20: Gastrozoid mit
mit positiver IIF der
I-Zellen und Nervenzel-
len im Ektoderm des
Rumpfs (Totalpräparat).
Das Hypostom zeigt eine
diffuse Fluoreszenz.
T = Tentakel, H = Hypostom
IZ = I-Zellen,
Nv = Nervenzellen



Abb.21: Ausschnitt aus dem Rumpfektoderm eines Gastrozoids (Total-
präparat). Die IIF zeigt eine positive Färbung der Zell-
oberfläche von I-Zellen (IZ)



Abb.22: Weiblicher Geschlechtspolyp. IIF an Totalpräparat das Bild zeigt die Gonophorensprossungszone und das Polypenköpfchen. I-Zellen (IZ), Nervenzellen (Nv) und entodermale Zellen (Enz) der Tentakuloide (Tu) sind positiv. (Totalpräparat)



Abb.23: Gonophor eines weiblichen Geschlechtspolypen. Das Ektoderm ist von Antikörper-positiven Nervenzellen durchzogen (IIF an Totalpräparat)

3.2.2.3. Bindungsmuster bei den Larvenstadien

Bei Total-Präparaten von Larven zeigte der Antikörpertest bei allen angewandten Fixiermethoden eine starke unspezifische Gesamtfluoreszenz. Durch die Gegenfärbung mit Evans Blau konnte diese unterdrückt werden. Das Testergebnis war nun überwiegend negativ. Da aber die Existenz von I-Zellen aus der histologischen Untersuchung (s.Kap.3.1.) bekannt war, wurde ein methodisches Problem als Grund für das negative Ergebnis vermutet.

Deshalb wurde die Färbung zunächst an Semidünnschnitten versucht. Hierbei wurde das in einigen Arbeiten (Brinn an Pickett, 1979; Carnegie et al., 1980; Takamiya et al., 1980; Werner, 1984) für die Immunhistochemie erfolgreich verwendete Glykolphosphat als Einbettmedium benützt. Es war jedoch überhaupt keine Antikörperfärbung möglich. Auch eine Modifikation der Fixierung (PFA/Pikrinsäure) und eine Nachbehandlung der Schnitte mit Proteasen, die die durch das Kunstharz maskierten antigenen Determinanten wieder zugänglich machen sollen (Putnam, 1943; Takamiya et al., 1978), verbesserte das Resultat nicht. Eine Übersicht über diese Versuche gibt Tab.2.

Aufgrund dieser methodischen Schwierigkeit wurden sämtliche Antikörpertests an Larven an Paraffinschnitten durchgeführt. Als Fixativ mit dem geringsten Hintergrund und dem relativ besten Erhalt von Gewebe und Antigenizität erwies sich Lavdowsky's Fixativ (s.Tab.2). Als Fixative ungeeignet für die Färbung von Schnitten mit dem vorliegenden Antikörper sind Glutaraldehyd, Paraformaldehyd und Bouin's Fixativ.

Die Antikörperfärbung wurde an Larven verschiedenen Alters durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß das Bindungsmuster vom Alter der Larven abhängt. Zusätzlich zu I-Zellen, deren spezifische Reaktion erst in späten Larvenstadien an einzelnen, ins Ektoderm ausgewanderten I-Zellen deutlich zu erkennen ist, kommt eine starke Färbung im Entoderm (Abb.24).

Bei etwa 40 h alten Larven erhält man die ersten positiven Signale. Hierbei handelt es sich um einige wenige Zellen im

Fixierung	Einbettung	Zusatzbehandlung	Ergebnis
1.5%pFA/GCHO	GMA (Standard)	-	keine Fluoreszenz
"	"	Pronase, 15 min 37°C	"
4%pFA/0.2% Pikrinsäure	"	-	schwache unspezifische Gesamtfluoreszenz
"	"	Pronase, 15 min 37°C	"
3.7%pFA	GMA: Infiltr.+ Einbett. b.4°C	-	keine Fluoreszenz
4%pFA	Paraplast	-	IZ sehr schwach positiv, Entoderm positiv; Rand des Ektoderms unspezifisch gelb-grün
"	"	Pronase, 15 min, 30min Fluoreszenz ähnlich wie ohne Enzym; bei 15 min Gewebe etwas zerfetzt, bei 30 min nur noch Fragmente	
"	"	Trypsin, 1, 2, 4h 37°C	IZ schwach positiv, Entoderm positiv; mit zunehmender Inkubationsdauer Gewebe fragmentierter, Fluoreszenz chaotisch
Bouin's	"	-	IZ sehr schwach positiv, Entoderm positiv
"	"	Pronase bzw. Trypsin wie oben	wie pFA/Enzymbehandlung
Lavdowsky's	"	-	IZ mäßig bis gut positiv, Entoderm stark positiv
"	"	Pronase bzw. Trypsin wie oben	Fluoreszenz ähnlich wie ohne Enzym; Gewebe bei längerer Inkubationsdauer zunehmend fragmentiert
100%Äthanol	"	-	IZ schwach positiv, Entoderm positiv; Background stärker wie bei Lavdowsky's

Tab.2: Verschiedene Methoden für die IIF an Schnittpräparaten; die Behandlungen wurden an Gastrozooiden und

5 Tage alten Planulae an 5 oder 7 µm (Paraffin) bzw. 2 µm (Semidünn) dicken Schnitten durchgeführt.

IZ= I-Zellen

Entoderm; außerdem sind nicht-zelluläre Strukturen, Bereiche der Mesogloea und Interzellularräume gefärbt. Mit zunehmendem Alter werden immer größere Bereiche des Entoderms positiv, sowohl Zellen als auch interzelluläre Strukturen. Eine genaue Lokalisation des Antigens erwies sich als außerordentlich schwierig, da sich die Färbung vor allem zwischen den Zellen konzentriert, allerdings auch - und meist besonders intensiv - an Rissen im Gewebe (solche entstehen leicht bei der verwendeten Fixiermethode, besonders in dotterhaltigen Geweben). Die Intensität der Färbung steigt mit zunehmendem Larvenalter drastisch an (Abb.25).



Abb.24: Planula (einige Tage alt) mit IIF positiven I-Zellen (IZ) im Ektoderm. Das Gewebe des Entoderms ist auch positiv. IIF an Längsschnitt 5 μ m

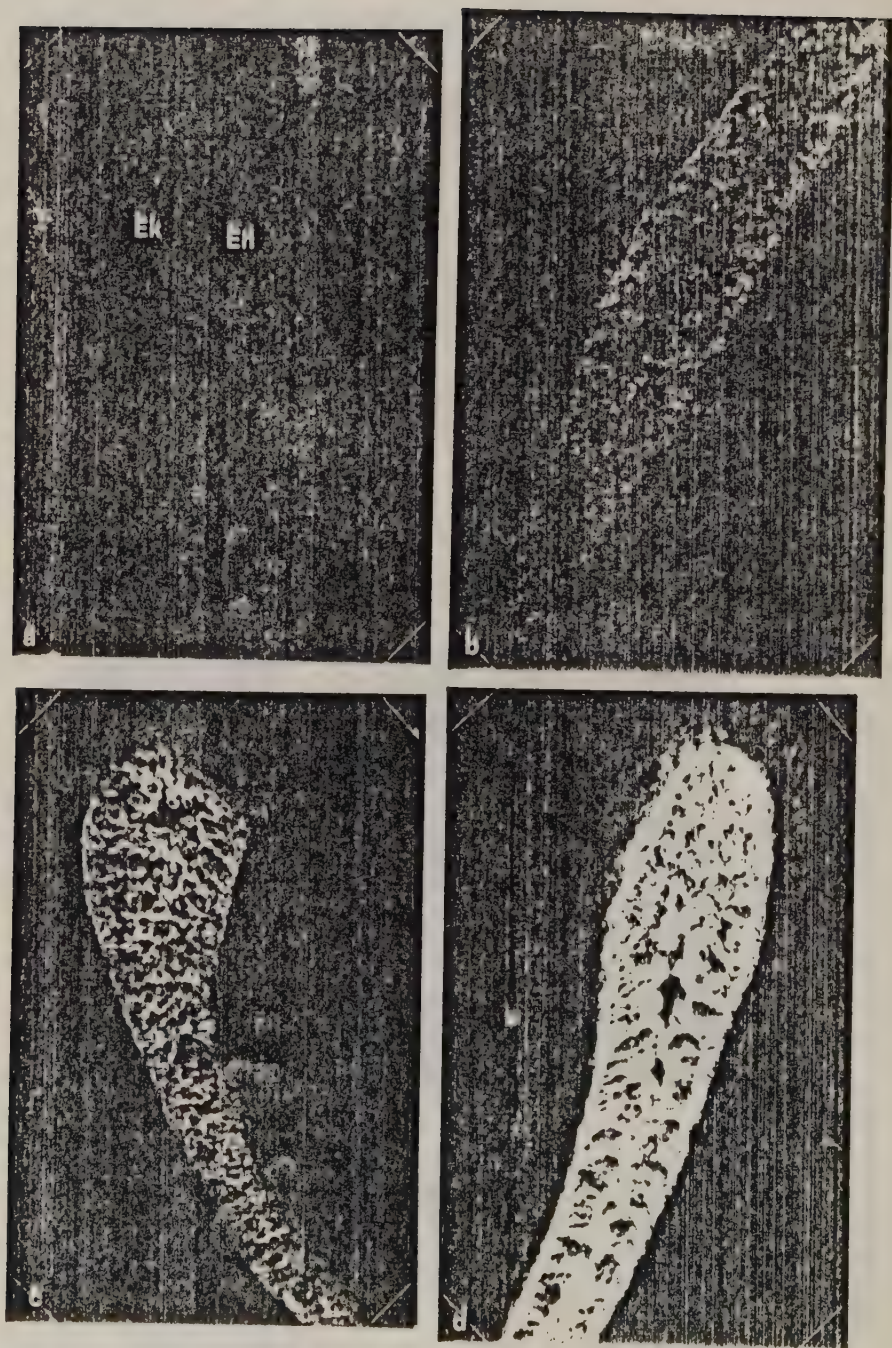


Abb.25: IIF an Schnittpräparaten (5 μ m) verschiedener Larvenstadien:
 a. Kontrolle (nur 2. Antikörper); b.-d. zunehmende Fluoreszenz
 des Entoderms bei 36 h (b), 50 h (c) und 5 Tage (d).

3.2.2.4. Bindungsmuster an Schnittpräparaten bei verschiedenen Stadien

Nach Entdeckung der Antikörperfärbung des Entoderms bei Larven wurde zum Vergleich auch bei den adulten Polypen, Gastrozoiden und Blastostylen, eine Antikörperfärbung an Paraffinschnitten durchgeführt. Wie bei Totalpräparaten sind die I-Zellen im Ektoderm gefärbt. Zusätzlich sind jedoch Zellen - sowohl Oberfläche als auch Zytoplasma - und z.T. Zellzwischenräume des Entoderms stark positiv. Hinzu kommt eine starke Variabilität, die Menge der entodermalen positiven Zellen und die Intensität der Färbung schwankt. Ferner sind - ausgedehnter als bei den Totalpräparaten - einige bis viele Entodermzellen der Tentakel positiv.

Zur Überprüfung dieses Färbeergebnisses wurden einige Kontrollversuche durchgeführt. Für sämtliche Versuche wurden normalerweise Polypen verwendet, die mindestens 24 h nicht gefüttert waren. Um sicherzugehen, daß die Entodermfärbung nicht durch Nahrungsteile beeinflußt wurde, wurden zur Kontrolle Polypen vom Stock abgeschnitten, 3 Tage gehungert und dann erst weiterbehandelt. Die Färbeergebnisse waren jedoch dieselben wie oben beschrieben.

Um festzustellen, daß es sich bei der Entodermfärbung tatsächlich um eine spezifische Fluoreszenz handelt, wurde eine Inkubation der Schnittpräparate mit proteolytischen Enzymen durchgeführt (Brandtzaeg, 1980). Eine solche Behandlung wird häufig sowohl zur Unterdrückung einer eventuellen unspezifischen Färbung als auch zur Verstärkung der spezifischen Fluoreszenz empfohlen (Huang et al., 1976; Reading, 1977; Denk et al., 1979; Hautzer et al., 1980; Takamiya et al., 1978, 1980). Im vorliegenden Fall war zwar das Gewebe infolge der enzymatischen Aktivität mehr oder weniger stark fragmentiert, soweit erkennbar wurde jedoch weder eine Verminderung der interzellulären Entodermfärbung noch eine Verstärkung der I-Zell-Färbung erreicht. Auch verschiedene Blockiermethoden mit unspezifischem Serum (hier Fötale Kälberserum und Ziegen血清) zur Unterdrückung des Hintergrunds (Burns, 1975) führten zu keiner Änderung des Bindungsmusters oder der Intensität.

So konnte davon ausgegangen werden, daß das gefundene Bindungsmuster eine spezifische positive Antikörperreaktion darstellte. Als Grund für die unterschiedlichen Farbeergebnisse zwischen Totalpräparaten und Schnitten wurde vermutet, daß der Antikörper womöglich nicht in tiefere Schichten des Gewebes von Totalpräparaten eindringen konnte. Um dies zu untersuchen, wurden ganze fixierte Polypen vor der Antikörperfärbung aufgeschnitten. Auf diese Weise konnte auch in Totalpräparaten das nun angeschnittene Entoderm gefärbt werden (Abb.26). Dieses Ergebnis zeigt, daß die Unfähigkeit des Antikörpers, tiefer ins Gewebe einzudringen, der Grund für die fehlende Entodermfärbung bei intakten Totalpräparaten ist.

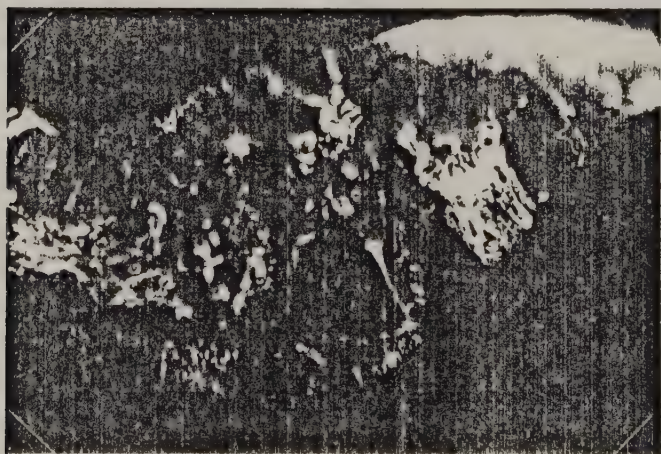


Abb.26: Aufgeschnittenes Totalpräparat eines Gastrozoids. Die IIF zeigt eine positive Färbung des Entoderms (En). Das Bild zeigt einen Längsschnitt durch den Rumpf, das Hypostom liegt links oben außerhalb des Bildausschnitts.

Die Antikörperfärbung von Schnitten wurde auch an weiblichen Blastostylen durchgeführt. Hier wurde ebenfalls neben der Färbung von I-Zellen im Ektoderm - I-Zellen kommen in relativ großer Dichte auf Höhe der Gonophorensprossungszone vor - eine Entodermfärbung gefunden (Abb. 27 und 28). Dabei ist das Innere der Gonophoren nicht einheitlich gefärbt. Vielmehr gibt es Bereiche, die stark positiv sind, und daneben auch negatives Gewebe. Daraus kann man schließen, daß das Gewebe innerhalb der Gonophoren nur teilweise entodermaler Herkunft ist.

Auffällig ist, daß die heranwachsenden Oocyten im Entoderm und in den Gonophoren nicht gefärbt sind. Da die I-Zellen des Ektoderms auch in Blastostylen Antikörper-positiv sind, bedeutet dies, daß die Antigenizität mit dem Übertritt ins Entoderm und somit mit dem Beginn der Oogenese verloren geht.



Abb.27: Schnitt (5 µm) durch ein Blastostyl. Die IIF zeigt positive I-Zellen (IZ) im Ektoderm und positives Entodermgewebe (En).

1=Schnittebene Abb.27
2=Schnittebene Abb.28

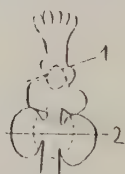


Abb.28: Schnitt durch einen Gonophor, der Oocyten fortgeschrittener Reife enthält. Oc = Oocyte

Der Gonophor enthält Antikörper-positives entodermales Gewebe (E)

50µm

3.2.3. Untersuchungen zur Klonpezifität des Antigens

3.2.3.1. Vergleich des Bindungsmusters verschiedener Klone

Das oben geschilderte Bindungsmuster der Antikörperfärbung war bei den Kolonien, an denen die Charakterisierung durchgeführt wurde, einheitlich. Bei einigen Primärpolypen und Larven jedoch, die von einer größeren Zahl (etwa zehn) verschiedener Kolonien abstammten, traten in einigen seltenen Fällen Abweichungen im Antikörperbindungsmuster auf. Dies gab Anlaß zu der Vermutung, daß eine Genotypspezifität des Antigens zugrunde liegen könnte. Als bei einer neuen Sendung von Kolonien Antikörperfärbungen an Totalpräparaten von Gastrozoiden bei einigen Kolonien ein anderes Bindungsmuster zeigten, wurde dieser Verdacht erhärtet. Deshalb wurden mit einer größeren Anzahl von Kolonien Versuche durchgeführt, um diese Vermutung bestätigen zu können.

Der Antikörpertest wurde an Totalpräparaten von Polypen von 67 verschiedenen Kolonien durchgeführt. Hierbei ist eine zusammenhängende Kolonie auf einem Schneckenhaus als Klon definiert (Buss et al., 1984). Bei Kolonien mit geschlechtsreifen Gonophoren beiderlei Geschlechts wurden jeweils einige Geschlechtspolypen und einige Gastrozooide getestet, bei den übrigen Kolonien insgesamt ca. 5 Polypen pro Kolonie.

Es lassen sich grob zwei Typen von Bindungsmustern unterscheiden. Im ersten Fall entspricht das Muster dem vorher geschilderten Typ, I-Zellen und Nervenzellen sind positiv, in Schnitten ist auch das Entoderm gefärbt. Solche Kolonien werden als I'Nv' bezeichnet. Auffällig ist, daß die Intensität der Färbung individuell ziemlich schwankt. Bei einigen Kolonien ist die Färbung der I-Zellen sehr stark, bei anderen mittel bis sehr schwach. Diese verschiedenen Intensitäten waren bei wiederholter Färbung weiterer Polypen aus einer Kolonie stets reproduzierbar.

Im zweiten Fall sind Nervenzellen und Entoderm (in Schnitten) ebenfalls positiv, jedoch sind die I-Zellen überhaupt nicht gefärbt. Das Antigen ist hier bei Totalpräparaten auf die Nervenzellen beschränkt. Solche

Kolonien werden als I-Nv' bezeichnet.

Die Tests wurden unabhängig voneinander 2-3 mal wiederholt. Die Ergebnisse ,die in Tab.3 zusammengefaßt sind, zeigen, daß die Anteile von I-Nv' und I-Nv' Kolonien etwa gleich sind. Der Anteil mit sehr starker Intensität ist jedoch relativ niedrig. Die Spezifität der Färbung ist weder von der Geschlechtsreife noch vom Geschlecht selbst abhängig, wie die Verteilung bei männlichen, weiblichen und nicht geschlechtsreifen Kolonien zeigt.

Kolonien	I ⁺ Nv ⁺			I ⁻ Nv ⁺
	stark	mittel	schwach	
♂	2	3	6	3
♀	1	3	4	5
ohne Blastostyle	2	4	9	25
Gesamtzahl	5	10	19	33

Tab.3: Ergebnis der Antikörperfärbung an 67
verschiedenen Kolonien

3.2.3.2. Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Klon-spezifität des Antigens und Histokompatibilität

Bei *Hydractinia* ist eine Art Histokompatibilitätsreaktion bekannt: Stolonen derselben oder nahe verwandter Kolonien können miteinander fusionieren, während Stolonen weiter entfernt verwandter Kolonien in der Regel nicht fusionieren, sondern sich abstoßen, wobei die Stolonen an der Kontaktstelle meist hyperplastisch werden (Hauenschild, 1954; Ivker, 1972; Buss et al., 1984). Die Tatsache, daß die Histokompatibilität mit der Verwandtschaft von Klonen korreliert ist, ist für die oben genannten Autoren ein Hinweis auf eine genetische Grundlage dieses Phänomens. Aufgrund der ebenfalls klonalen Antigenunterschiede, die in der vorliegenden Untersuchung gefunden wurden, stellt sich die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dieser Antigenspezifität und der Histokompatibilität bestehen könnte.

Die Gewebeverträglichkeit zwischen zwei verschiedenen Kolonien kann man testen, indem man kleine Stückchen der Stolonenplatte mit einigen Polypen darauf explantiert und so festwachsen läßt, daß die Stolonen der beiden Explantate aufeinander zuwachsen (McFadden et al., 1984). Sind sie verträglich, findet eine Fusion statt; bei Unverträglichkeit erfolgt eine Abstoßungsreaktion. Dieser Versuch wurde für einige Kolonien mit allen möglichen Kombinationen von I'Nv' und I-Nv' durchgeführt. Das Ergebnis dieses Explantationsversuchs ist in Abb.29 dargestellt. Nur ein Teil der Explantate war auswertbar, da es schwierig ist, ein Absterben der explantierten Polypen zu verhindern, auch wenn sie auf der Unterlage festgewachsen sind. Dennoch zeigen die Ergebnisse eine gewisse Tendenz. In allen vier Fällen, bei denen ein negativer Klon beteiligt war, davon zweimal in Kombination mit einem negativen und zweimal mit einem positiven, wurden die Stolonen hyperplastisch und stießen sich ab. Dabei war es gleichgültig, ob Stolonen auf Stolonen stießen (3 Fälle), oder ob die Stolonen des einen Explantats auf den inzwischen gebildeten Stolonenplattenrand des anderen trafen (1 Fall).

In den drei Kombinationen von je zwei positiven Klonen fand eine Fusion der Stolonen statt.

	101 +	2 +	110 +	117 +	118 +	103 -	107 -	120 -
101 +	F	-	-	F	F	-	-	-
2 +		-	-	F	-	-	-	-
110 +			F	-	-	-	A	A
117 +				F	-	-	-	-
118 +					-	-	-	-
103 -						F	A	A
107 -							F	-
120 -								F

Abb 29: Ergebnisse des Explantationsversuchs zur Fusion/Abstoßung

I-Zell-positiver und -negativer Kolonien.

Die Zahlen sind die Nummern der einzelnen Kolonien, das Vor-

zeichen entspricht der Antigenizität: + = I⁺Nv⁺

- = I⁻Nv⁺

F = Fusion

A = Abstoßung

- = Versuch nicht auswertbar

4. DISKUSSION

4.1. Entwicklung und Zelldifferenzierung: Histologische Befunde

4.1.1. Überblick über die Entwicklung

Die gezeigten Ergebnisse lassen sich wie in Abb.30 zusammengefaßt darstellen. Die Entwicklung ist folgendermaßen gegliedert: Die Furchung ist eine Phase starker Zellvermehrung und führt zu einer soliden Morula. Bei 10 h tritt eine Verlängerung des Zellzyklus ein, mit der die Bildung der Keimblätter Ektoderm und Entoderm, also die Gastrulation einhergeht. Einige Stunden danach finden erste Differenzierungsereignisse statt: es treten frühe Stadien von I-Zellen (Prä-I-Zellen) und etwas später Nematoblasten auf. Gleichzeitig wird die Vermehrung der Gesamtzellzahl geringer. Bei der 50 bis 60 h alten Planula sind schließlich alle definitiven Zelltypen gebildet. Nachdem die Larve voll entwickelt ist, kann sie in die Metamorphose gehen.

Die vorliegenden Befunde stellen eine Ergänzung und teilweise Bestätigung klassischer Arbeiten (Bunting, 1894; Teissier, 1927; van de Vyver, 1964) über die Entwicklung von *Hydractinia* dar. In einigen Punkten bestehen jedoch auch Diskrepanzen zu den früheren Arbeiten, welche in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

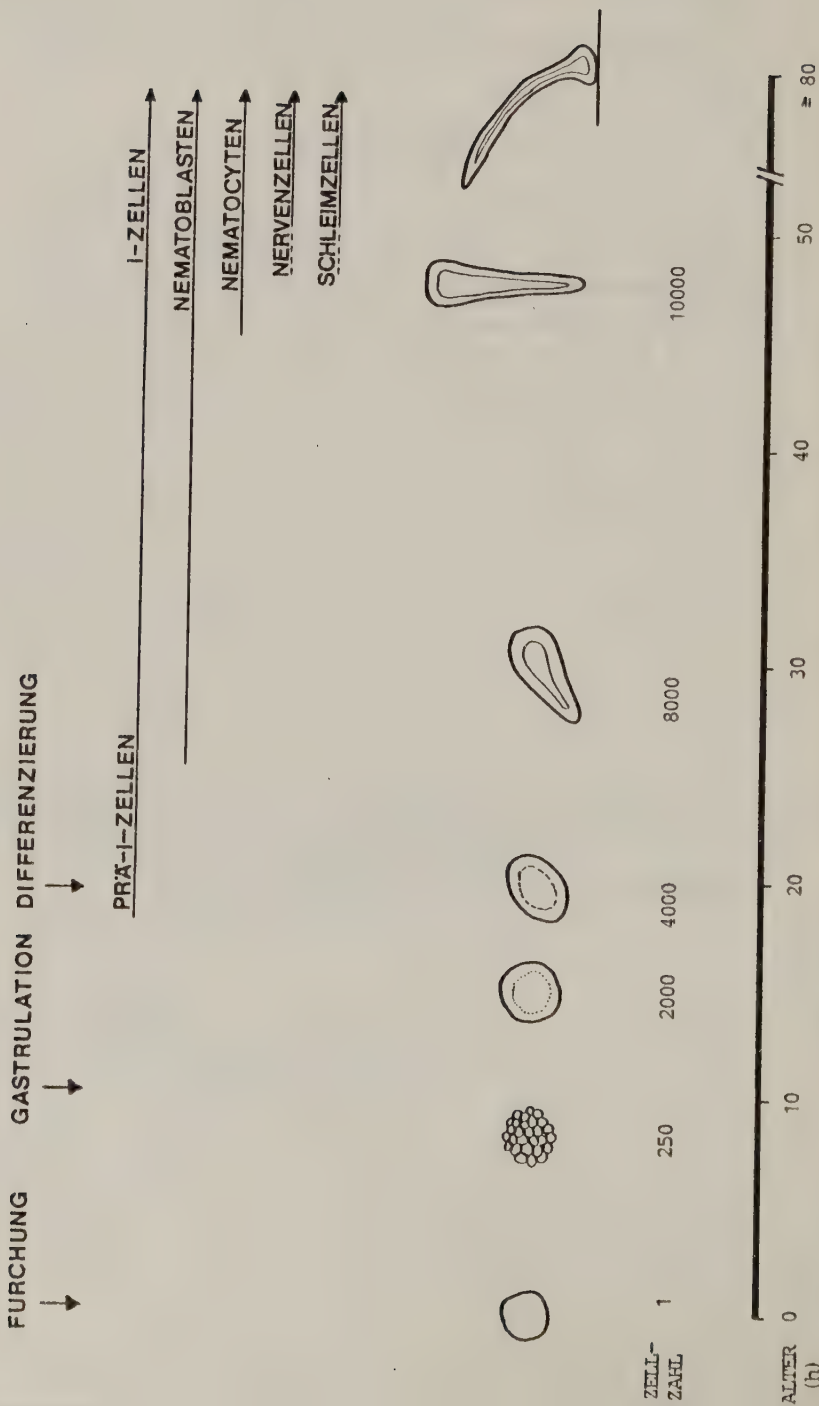


Abb. 30: Verlauf von Entwicklung und Differenzierung bei *Hydractinia echinata*.

4.1.2. Frühentwicklung

4.1.2.1. Furchung und Morulabildung

Der rasche und gleichmäßige Anstieg der Zellzahl während der ersten 8-10 h mit einer Zellzyklusdauer von nur etwa 1 h deutet darauf hin, daß es sich hier um Furchungsteilungen handelt. Während dieser Phase folgen mitotische Teilungen aufeinander, ohne daß dazwischen Synthese von RNS stattfindet. Für dieses für die Furchung typische Verhalten spricht die Abwesenheit von Nukleoli bei 8 h. Zu diesem Zeitpunkt ist der Keim ein solider kugeliges Zellhaufen, der im Verlauf von ca. 8 Teilungszyklen gebildet wurde. Da keine Hohlraumbildung eintritt, wird dieses Stadium als Morula (Dawydoff, 1925) oder Sterroblastula (van de Vyver, 1980) bezeichnet.

Zwar sprechen Bunting (1894) und Teissier (1927) von der Bildung einer Furchungshöhle im 32- bzw. 8-Zellen-Stadium, jedoch neuere Untersuchungen von van de Vyver (1964, 1967) stimmen in diesem Punkt mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit überein. Die Bildung einer Morula wird als typisch für Hydrozoa der Unterfamilie Filifera angesehen (van de Vyver, 1967). Derselbe Furchungstyp wird auch bei einigen anderen Vertretern der Filifera, z.B. *Clava squamata* (Harm, 1903), *Cordylophora caspia* (van de Vyver, 1967) und *Corydendrium parasiticum* (Glätzer, 1971) gefunden.

4.1.2.2. Gastrulation

Wenn kein Blastocoel gebildet wird und bereits während der Furchung durch radiäre Teilung der Blastomeren Zellen ins Innere gelangen, so repräsentieren diese Zellen schon prospektive Entodermzellen. Somit überschneidet sich die Keimblätterbildung gewissermaßen mit der Furchung. Dieser Gastrulationsmodus wird als Morula-Delamination bezeichnet (Siewing, 1969). Er wurde bereits von van de Vyver (1964) für *Hydractinia* als zutreffend angesehen. Wegen der frühen Verlagerung von Zellen nach innen ist es allerdings

schwierig, den genauen Zeitpunkt der Gastrulation zu erkennen. Entsprechend unterschiedlich sind in den klassischen Arbeiten die Angaben zum Beginn der Gastrulation. Teissier (1927) setzt sie im Anschluß an das 8-Zellen-Stadium an, da hier infolge der Furchungsteilungen Zellen nach innen gelangen. Van de Vyver (1964) sieht als Zeichen für den Beginn der Gastrulation die beginnende Heterogenität der Blastomeren an, die sie nach dem 32-Zellen Stadium feststellt: die inneren Zellen enthalten nur Dotter, während die peripheren Zellen eine als Ectoplasma bezeichnete Zone besitzen, die andere Färbereigenschaften als das übrige Zytoplasma zeigen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit über die Zellzyklen eröffnen einen neuen Weg, den Beginn der Gastrulation zu erkennen. Bei 8-10 h (entsprechend ca. 250-500 Zellen) findet eine drastische Änderung der Zellzyklusdauer statt, sie verlängert sich um das Vier- bis Fünffache. Etwa zu diesem Zeitpunkt beginnt die Synthese von RNS in den Zellkernen, da die Zellen des 8 h Keimes noch keine Nukleoli - als Indikator für RNS-Synthese - besitzen. Bei 15 h hingegen sind in fast allen Zellkernen in beiden hier bereits sichtbaren Keimblättern Nukleoli vorhanden. Daher scheint bei *Hydractinia* die Gastrulation ungefähr mit 10 h zu beginnen.

Bei *Xenopus* werden diese Ereignisse - drastische Verlängerung der Zellzyklusdauer und Beginn der RNS-Synthese - als "midblastula transition" bezeichnet. Sie finden stets nach der 11. Furchungsteilung statt und gehen der Gastrulation unmittelbar voraus (Newport and Kirschner, 1982).

Als Ende der Gastrulation gilt allgemein das Einsetzen von Differenzierung in beiden Keimblättern. Die Übergänge können jedoch auch hier fließend sein. Zwischen 15 und 20 h beginnt mit Bildung der Prä-I-Zellen (s.3.1.7.1.) bereits die Differenzierung; die endgültige Trennung von Ektoderm und Entoderm, als deren Zeichen die Bildung der Mesogloea betrachtet werden kann, vollzieht sich erst mit etwa 20 bis 25 h. Demnach fällt das Ende der Gastrulation etwa in den Zeitraum zwischen 15 und 20 h.

4.1.2.3. Bildung eines Gastralraums durch Zelltod?

Entgegen früheren Arbeiten über *Hydractinia* und verwandte Gattungen (z.B. *Hydra*: Korotneff, 1883; *Cordylophora*: Morgenstern, 1901; *Clava*: van de Vyver, 1967; *Podocoryne*: Bodo und Bouillon, 1968) konnte in der vorliegenden Arbeit zu keinem Zeitpunkt eine Hohlraumbildung durch Degeneration und Histolyse gefunden werden.

Van de Vyver (1964) beschreibt diesen Vorgang zur Gastrocoelbildung im Anschluß an die Morula-Delamination: Nach dem 64-Zellen-Stadium bekommen die Kerne der inneren Zellen ein "pyknotisches Aussehen". Im Folgenden finden im Inneren praktisch keine Mitosen mehr statt, im Gewebe bilden sich Spalten, die meisten(!) Zellen degenerieren und werden von den noch intakten Zellen phagozytiert. Das Ergebnis ist eine Gastrula, deren so entstandener Gastralraum innen von einer Schicht entodermaler Zellen ausgekleidet wird. Derselbe Vorgang wird auch bei *Clava squamata* (van de Vyver, 1967) beobachtet. Die ungleiche Zellteilungsaktivität im Ektoderm und degenerierenden Entoderm wird bei *Clava* durch radioaktive Markierung gezeigt: nach einer Pulsmarkierung mit ^3H -Thymidin werden in der peripheren Zellschicht wesentlich mehr markierte Zellen gefunden wie im Inneren. In einer neueren Übersichtsarbeit (van de Vyver, 1980) wird diese Art der Gastralraumbildung als allgemein gültig für die Gruppe Filifera und Capitata tubularoidea angegeben. Diese Art der Hohlraumbildung, z.B. bei *Hydra*, wurde allerdings in der Vergangenheit gelegentlich bezweifelt (Brauer, 1891a). Auch bei *Corydendrium parasiticum* (Glätzer, 1971), dessen Entwicklung mit *Hydractinia* einige Gemeinsamkeiten aufweist, tritt sie nicht auf.

In der vorliegenden Arbeit, bei der die frühesten in Schnitten untersuchten Stadien 8h alt waren und etwa 250 Zellen besaßen, d.h. seit dem 64-Zellen-Stadium etwa 3 Zellzyklen durchlaufen hatten, konnten die Befunde über eine Degeneration der inneren Zellen nicht bestätigt werden. Der Keim besteht nach wie vor aus einem soliden Zellhaufen (s.

Abb.5). Zelltrümmer und ungewöhnlich kondensierte Zellkerne sind nicht vorhanden. Man sieht Mitosen gleichmäßig über die Zellen verteilt. Auch im nächsten untersuchten Stadium von 15 h gibt es keinerlei Anzeichen der Degeneration oder Hohlraumbildung.

Auch ältere Stadien, Präplanula und Planula von *Hydractinia*, weisen in meiner Arbeit in Semidünnschnitten niemals einen Hohlraum auf, wenn auch die dotterreichen zentralen Zellen sehr dünnwandig und z.T. vakuolisiert aussehen. Einen Hohlraum gibt es erst bei sehr alten Planulae (2 bis 4 Wochen), die durch Aufbewahrung bei 4°C in sterilem Seewasser an der Metamorphose gehindert wurden und alle Dotterreserven aufgezehrt haben (Plickert, pers. Mitteilung).

Ein Grund für diese Diskrepanz der Befunde könnte vielleicht in den angewandten Methoden liegen. Bei der Fixierung mit einigen Fixativen, darunter auch das in älteren Arbeiten häufig verwendete Bouin's, und der nachfolgenden Entwässerung kommt es sehr leicht zu Schrumpfungen und Rissen vor allem dotterreichen embryonalen Gewebes. Deshalb wäre möglich, daß sich die genannten Interpretationen der Paraffinschnitte einem methodischen Problem verdanken.

4.1.3. Differenzierung verschiedener Zelltypen

4.1.3.1. Die Entstehung der I-Zellen

Als I-Zellen wird übereinstimmend ein bestimmter Zelltyp der Cnidaria bezeichnet, der folgende Charakteristika aufweist:

1. Als morphologische Kriterien gelten die typische oval-spindelförmige Gestalt, ein relativ großer runder Kern mit ein bis mehreren prominenten Nukleoli und ein verhältnismäßig geringer Anteil an Zytoplasma. Das Zytoplasma ist aufgrund seines großen RNA-Gehalts stärker mit basophilen Farbstoffen anfärbbar als das übrige Gewebe.

2. Funktional stellen I-Zellen embryonale multipotente Reservezellen dar, die beim Adulten den Nachschub vor allem von Nematocyten, Nervenzellen und Keimzellen sicherstellen.

Diese Charakterisierung soll die Schwierigkeit verdeutlichen, die damit verbunden ist, zu bestimmen, ab wann embryonale Zellen wirklich I-Zellen sind: um als solche bezeichnet werden zu können, müßten morphologische und funktionale Kriterien erfüllt sein. Im vorliegenden Fall wurde die Bestimmung der I-Zellen anhand der genannten morphologischen Merkmale vorgenommen, wobei eine Schwierigkeit darin besteht, daß bei Gastrula- und Präplanula-Stadien die Kriterien der Basophilie und der Kernmorphologie auf nahezu alle Zellen, vor allem des Entoderms zutreffen. Zudem ist das Erkennen der Zellgrenzen im Entoderm, wahrscheinlich durch die großen Dottermengen, schwierig. In frühen Stadien ist außerdem die Unterscheidung zwischen I-Zellen und jungen Nematoblasten nur anhand der bei Letzteren vorhandenen Nesselkapsel möglich. In ausgewachsenen Planulae ist die morphologische Erkennung der I-Zellen leichter, da hier das Zytoplasma der ento- und ektodermalen Epithelzellen nicht mehr basophil ist und die meisten Nematoblasten einen kondensierten, oft sichelförmigen Kern besitzen. Von Zellen mit typischer I-Zell-Morphologie kann erst bei Stadien älter als 50 h gesprochen werden, hier ist ihre Menge schon beachtlich.

In meiner Arbeit werden allerdings zu einem recht frühen Zeitpunkt, bei 15-h-Embryonen vereinzelt, bei 20 h etwas zahlreicher Zellen gefunden, die als Vorläufer oder Frühstadien von I-Zellen in Frage kommen (Abb.9 und 10). Ihr Kern ist untypisch, relativ klein und dicht, aber ihr dotterarmes bis dotterfreies Zytoplasma ist basophiler als das der übrigen dotterreichen Zellen. Im Vergleich zu den polyedrischen voluminösen Entodermzellen sind sie klein und ihre Form erinnert oft an I-Zellen. Die ultrastrukturellen Befunde bei 25 h alten Stadien (Abb.15c) bestätigen, daß dotterfreie Zellen mit sehr wenig Zytoplasma im Entoderm vorhanden sind.

Die Anzahl dieses als Prä-I-Zellen bezeichneten Zelltyps nimmt zwischen 15 und 20 h deutlich zu. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Zunahme auf eine Neuentstehung aus Entodermzellen zurückzuführen ist. In einigen seltenen Fällen sieht man eine Prä-I-Zelle direkt basal an Ektodermzellen anschließen. Ob Letztere der Ursprung dieser Zelle war, kann nicht entschieden werden. Da aber die überwiegende Zahl der prospektiven I-Zellen inmitten von Entodermzellen liegt, kann davon ausgegangen werden, daß auch im Fall von *Hydractinia* die I-Zellen entodermalen Ursprungs sind.

Aufgrund dieser Differenz zwischen frühen (=Prä-) I-Zellen und späten typischen I-Zellen ist es nicht verwunderlich, daß die Existenz von I-Zellen bei Vertretern der Gattungen *Clava*, *Cordylophora* und *Hydractinia* (van de Vyver, 1964, 1967) wie auch bei *Obelia* und *Phialidium haemisphaericum* (Bodo und Bouillon, 1968) relativ spät beschrieben werden. Erst nach Bildung der Mesogloea werden bei den Planulae dieser Gattungen I-Zellen gefunden, folglich wird vermutet, daß die zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Nematoblasten keinesfalls aus I-Zellen entstanden sein können (vgl. Kap.4.1.3.2. und 4.1.3.3.). Auch bei *Pennaria tiarella* werden in einer älteren Arbeit (Summers und Haynes, 1969) im Gegensatz zu neuen Befunden von Martin and Thomas (1983) I-Zellen erst zu diesem späten Zeitpunkt gesehen.

Die Befunde über das frühe Auftreten von Zellen vom Typ der hier geschilderten Prä-I-Zellen werden jedoch in einer Reihe von Arbeiten an verschiedenen Hydrozoen bestätigt. Glätzer (1971) beschreibt bei *Gastrulae* von *Corydendrium parasiticum* einen Zelltyp als "Vorläufer von I-Zellen oder schon I-Zellen selbst": Sie haben einen vergleichsweise kleinen Kerndurchmesser und eine basophile Plasmazone ist spindelförmig um den Kern ausgebildet.

Auch die Zellen der "interstitiellen Schicht" bei *Tubularia mesembryanthemum* (Brauer, 1891b), gehen aus "kleineren rundlichen Zellen" hervor. Für *Hydra* (Brauer, 1891a), *Gonothyrea loveni* (Wulfert, 1902), *Eleutheria dichotoma* (Weiler-Stolt, 1960), *Eudendrium armatum* (Wasserthal, 1973)

und *Pelmatohydra robusta* (Noda und Kanai, 1980) wird die Bildung früher I-Zellen in derselben Weise beschrieben. Letztere betonen, daß diese "differenzierenden I-Zellen" deutlich kleiner und nicht so basophil sind wie bei adulten Hydroidpolypen. Fennhoff (1980) schildert die Entstehung von frühen I-Zellen bei *Tubularia crocea* unmittelbar nach der Keimblätterbildung: Der Kern der Vorläuferzelle liegt peripher und wird von Giemsa-positiven Plasma umgeben; durch unsymmetrische Teilung dieser Vorläuferzellen entstehen "prospektive I-Zellen".

In einer neuen ultrastrukturellen Studie an *Pennaria* zeigen Martin und Archer (1986), daß frühe, von Entodermzellen abstammende I-Zellen eine große Zahl verschiedener Granula enthalten. Die Kernmorphologie ist noch nicht so ausgeprägt wie bei typischen I-Zellen. Im Lauf der Entwicklung verschwinden die Granula allmählich und der Nukleolus tritt groß und deutlich hervor. In der ausgereiften Planula von *Pennaria* findet man nur noch typische I-Zellen vor. Auch bei einer Anthozoen-Art wurden im Gastrocoel einzelne, während der Gastrulation auftretende Zellen, die einen für diesen Zeitpunkt sehr geringen Dottergehalt aufwiesen, gefunden (Schäfer, 1980). Diese Zellen hält der Autor für I-Zellen oder Vorläufer davon (Schäfer, pers. Mitteilung).

Bei denjenigen oben zitierten Hydrozoenarten, deren Entwicklung über ein Planulastadium verläuft, wird als Ursprungsort der I-Zellen in der Regel das Entoderm angegeben. Der Zeitpunkt, zu dem (aus dem Entoderm gewanderte) I-Zellen auch im Ektoderm auftreten, variiert von Art zu Art. Jedoch bei Gattungen mit direkter Entwicklung einer Aktinula, z.B. *Tubularia*, entstehen I-Zellen durch Abschnürung von Ektodermzellen. Durch Bildung der Mesogloea werden diese I-Zellen dann gleich dem Ektoderm zugeordnet. Der Ursprung der I-Zellen im Ektoderm wird von van de Vyver (1968) für Formen, die als Larvenstadium eine Aktinula bilden, als typisch angegeben. Auch beim Süßwasserpolytyp *Hydra* liegt eine direkte Entwicklung vor, aus der Oothek schlüpft gleich der junge Polyp. Auch hier sind nach Brauer (1891a) und Noda und Kanai (1980), die jeweils eine Art von *Hydra* untersuchten, die ersten I-Zellen, die an

der Basis der äußersten Zellschicht gefunden werden, Abkömmlinge dieser ektodermalen Schicht.

Eine Nestbildung früher I-Zellen, wie sie z.B. bei Arten von Eudendrium (Hargitt, 1903; Mergner, 1957) gefunden wird, konnte bei Hydractinia nicht beobachtet werden.

4.1.3.2. Die Entwicklung der Nesselzellen

Auftreten und Vermehrung der Nematoblasten wurden in der vorliegenden Arbeit quantitativ erfaßt. Bei 25 h alten Larven zeigt die ultrastrukturelle Untersuchung, daß bereits sehr frühe Nematoblasten vorhanden sind. Mit 28 h besitzt eine Larve durchschnittlich 80 Nematoblasten. Die Zellmorphologie ähnelt der von I-Zellen sehr. Erst mit zunehmender Größe der differenzierenden Kapsel wird der Zellkern kleiner, kompakter und allmählich sichelförmig. Letzteres trifft man erst in 44-50h-Stadien an, ebenso wie eine größere Zahl ausdifferenzierter Nematocyten im Ektoderm. Letztere haben also etwa 10-15 h für ihre Differenzierung benötigt, was verglichen mit Differenzierungszeiten von Nematocyten bei Adulten - bei Hydra beispielsweise dauert die Entwicklung der Nematocysten je nach Kapseltyp 2-3 Tage (David and Gierer, 1974) - sehr kurz ist. Diese kurze Differenzierungszeit scheint ein Spezifikum der Embryonalentwicklung zu sein.

Die Beobachtungen über den Zeitpunkt des Auftretens der Nematoblasten kurz nach Bildung der Mesogloea stimmen im Wesentlichen mit den Befunden anderer embryologischer Studien an Hydroiden überein (Bunting 1894; Mergner, 1957; Weiler-Stolt, 1960; van de Vyver, 1964, 1967; Glätzer, 1971; Martin and Thomas, 1981b). Über die Dauer der Nematocytendifferenzierung werden meist nur vage Angaben gemacht. Sie bewegt sich im Rahmen der bei Hydractinia gemachten Beobachtungen.

4.1.3.3. Herkunft der Nematoblasten

Bei Larven wurden einige Stunden nach dem Erscheinen der Prä-I-Zellen Nematoblasten und entsprechend später Nematocyten gefunden. Da ihre Anzahl im Laufe der Planulaentwicklung stetig zunimmt, sich aber differenzierende Nematoblasten selbst nicht mehr durch mitotische Teilung vermehren, liegt die Vermutung, daß I-Zellen die Vorläufer sind, sehr nahe. Die bei diesen Zellen vorhandenen Mitosen kennzeichnen sie als proliferierende Population. Wären andere Zellen, z.B. normale Entodermzellen, die ab 50 h selbst nicht mehr proliferieren, Vorläufer der Nematoblasten, müßte ihre Zahl mit der Zunahme der Nesselzellen abnehmen. Dies ist jedoch nicht der Fall (s.Tab.1). So wird es für sehr wahrscheinlich gehalten, daß zumindest ab dem Präplanulastadium Nematoblasten aus I-Zellen hervorgehen.

Die Herkunft der frühen Nematoblasten allerdings, die zu einem Zeitpunkt (bei etwa 25 h) auftreten, wo die Differenzierung der I-Zellen auch noch nicht besonders weit fortgeschritten ist, läßt sich auch mit Daten der vorliegenden Arbeit nicht feststellen.

Bei verschiedenen anderen Hydrozoenarten gibt es unterschiedliche Befunde und Vermutungen über die Herkunft der Nematoblasten. Einige Autoren sind der Meinung, daß die ersten Nematoblasten direkte Differenzierungsprodukte von Entodermzellen sind. Vor allem bei Arten, die während des Planulastadiums erst spät oder überhaupt keine I-Zellen besitzen wie z.B. *Coryne* (Van de Vyver, 1967), *Ptilosarcus* (Chia and Crawford, 1977), *Sarsia* und *Gonionemus* (Bodo und Bouillon, 1968) liegt diese Vermutung nahe.

Bei *Hydractinia* schildert van de Vyver (1964) die Entstehung der ersten Nematoblasten aus normalen Entodermzellen, die ihren Dotter eliminiert haben.

Glätzer (1971) führt I-Zellen und Cnidoblasten auf die gleiche "von prospektiven Entodermzellen gesonderte Urform" zurück, wobei er eine "frühzeitige Trennung der amöboid beweglichen I-Zellen von den Cnidoblasten" vermutet.

In einigen anderen Arbeiten wird jedoch eine aus sehr frühen I-Zellen gebildete "Cnidoblasten-Anlage" beschrieben (z.B. bei Eudendrium, Mergner, 1957; bei Pennaria, Martin und Archer, 1986). Hier werden die Nematoblasten von Anfang an als Abkömmlinge von I-Zellen betrachtet.

Martin und Thomas (1981b, 1983) stellten fest, daß nach Elimination der I-Zellen durch eine Colchicinbehandlung unmittelbar nach der Gastrulation u.a. die Bildung von Nematoblasten ausbleibt. Dieser Befund könnte bedeuten, daß Letztere Derivate der I-Zellen sind. Es könnte allerdings auch sein, daß sich teilende Entodermzellen, die durch den Teilungsschritt I-Zellen und Nematoblasten hervorbringen, eliminiert wurden.

4.1.3.4. Zellflußmodell zur Nematocytendifferenzierung

Aufgrund der vorliegenden quantitativen Daten über I-Zellen, Nematoblasten und Nematocyten (Abb.15) wird ein Modell zum Zellfluß dieser Populationen vorgeschlagen.

Für die Nematocyten kann man im Zeitraum zwischen erstem Auftreten (etwa bei 40 h) und 100 h eine Zuwachsrate von rund 15-20 Zellen/h errechnen (s. Abb.15c). Dafür ist eine vorausgehende Nematoblastenproduktion derselben Rate erforderlich. Der zeitliche Abstand, der zwischen dem Auftreten von ersten Nematoblasten und fertigen Kapseln liegt, beträgt rund 10 h und entspricht der Differenzierungszeit der Nesselkapseln. Wenn die I-Zellen bei jedem Teilungszyklus jeweils eine Tochterzelle für die Nematocytendifferenzierung liefern und die andere Tochterzelle zur Aufrechterhaltung der I-Zell-Population als proliferierende I-Zelle weiterbesteht, ihre Anzahl selbst also stagniert, läßt sich allein aus der Nematoblastenproduktionsrate die Dauer eines I-Zell-Zyklus bestimmen. Ausgehend von einem bei 30 h existierenden Niveau von 200 I-Zellen würden bei einem Teilungszyklus 200 Tochterzellen zu Nematoblasten. Fordert man wie in unserem Beispiel die Produktion von etwa 20 Nematoblasten/h

entsprechend 200 Nematoblasten/10h, so ergibt sich ein I-Zell-Zyklus von 10 h. Werden - bei gleicher Zellzykluszeit - etwas weniger als 50% der Tochterzellen für die Nematoblastenbildung abgezweigt, kann neben einer sich stetig erhöhenden Nematoblastenproduktionsrate gleichzeitig ein Anstieg bei der I-Zell-Population erreicht werden. Werden z.B. nur 35% der Tochterzellen zu Nematoblasten, so wächst die I-Zell-Population innerhalb von 5 Zellzyklen à 10 h (von 30 bis 80 h, s. Abb.15a) von 200 auf 350 Zellen an, während gleichzeitig mehr als 1000 Nematoblasten produziert werden.

Das Modell erlaubt, daß die I-Zellen sich selbst vermehren können und zugleich als Vorläufer für die Nesselzellbildung in Frage kommen. Hiermit beschreibt es die tatsächlichen Verhältnisse, bei denen eine starke Zunahme der Nesselzellen gleichzeitig mit einer geringen Vermehrung der I-Zellen stattfindet. 10 h sind für einen I-Zell-Zyklus eine recht kurze Zeit (z. Vgl. 24 h bei adulten Hydren, Campbell and David, 1974). Über Zellzyklen bei Planulae anderer Spezies liegen bisher keine Daten vor, doch man kann, wie bereits der Fall der Nesselkapselentwicklung andeutet (s.Kap.4.1.3.2.), mit völlig anderen zeitlichen Verhältnissen rechnen wie bei Adulten, da die Entwicklungsdauer der Larven insgesamt sehr kurz ist.

4.1.4. Ein Modell zum Zellfluß während der Entwicklung

Aus der Zunahme der Gesamtzellzahl im Lauf der Larvalentwicklung (Abb.2) läßt sich über mehrere Stufen eine Abnahme der Zellteilungsaktivität verfolgen. In Abb.31 ist schematisch dargestellt, wie man sich aufgrund der vorhandenen Daten den Zellfluß während der Entwicklung vorstellen kann.

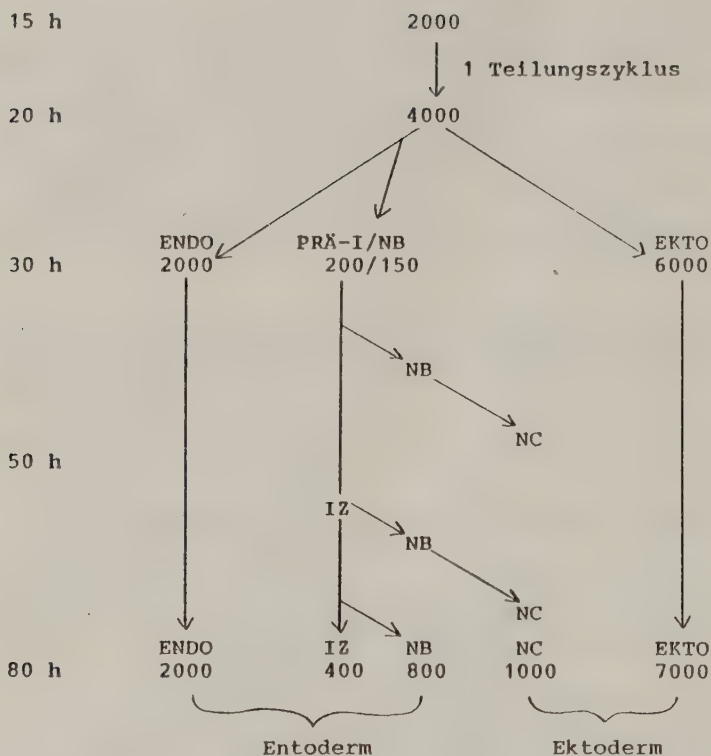


Abb.31: Zellfluß während der Embryonalentwicklung.

Die Zahlen sind die Anzahl des jeweiligen Zelltyps/Larve in einem bestimmten Entwicklungsstadium (das Alter ist jeweils auf der linken Seite in Stunden angegeben).

Nervenzellen und Schleimzellen des Ektoderms sind nicht gesondert aufgeführt: die Schleimzellen betragen bei der ausgewachsenen Planula mit 5% etwa 400 Zellen; die Nervenzellen belaufen sich nach aus Mazerationen ermittelten Zahlen auf etwa 150/Planula. Diese Zelltypen sind in der Gesamtzahl der Ektodermzellen enthalten.

Die Furchungsteilungen vollziehen sich in sehr rascher Folge. Einen ersten Einbruch stellt die Verlangsamung der Zellzyklen mit 8 h, kurz vor dem Beginn der Gastrulation, dar.

Vorausgesetzt, daß der Großteil der Zellen mitotisch aktiv bleibt, verdoppelt sich die Zellzahl in einem Zyklus von 5 h auf 4000 Zellen bei 20 h (Abb.2). Die nächste Teilungsrunde, die entweder länger dauern muß oder nicht mehr alle Zellen betrifft, führt im Ektoderm zu einer weiteren Verdopplung der Gesamtzellzahl im Lauf der nächsten 30 h. Ab hier findet zusätzlich zur Einwanderung der ausdifferenzierten Nematocyten aus dem Entoderm nur noch eine geringe Zunahme der Zellzahl statt (Tab.1). Dies ist auch aus den Daten zum Mitoseindex (Abb.3) ersichtlich, wo ab 50 h im Ektoderm keine Mitosen stattfinden. Die ca. 8000 Zellen des Ektoderms der ausgewachsenen Planula setzen sich aus Epithelmuskelzellen, Nervenzellen, Schleimzellen und Nematocyten zusammen.

Die in Mazerationen gefundenen Nervenzellen entsprechen wahrscheinlich den von Weis et al. (1985) beschriebenen Nervenzellen, die im Ektoderm parallel zur Mesogloea orientiert liegen. In der Arbeit von Weis et al. (1985) werden außerdem neurosensorische Zellen, deren Zilien an die Peripherie reichen und die hauptsächlich im posterioren Ektoderm der Planula sitzen, genannt. Diese Zellen konnten mit den Methoden der vorliegenden Arbeit nicht erfaßt werden.

Die Herkunft der Nervenzellen wurde bisher nicht untersucht. Es ist jedoch anzunehmen, daß sie Abkömmlinge von I-Zellen sind, da bei der nahe verwandten Art *Pennaria tiarella* gezeigt werden konnte, daß die Entwicklung von "Ganglionzellen" (im Gegensatz zu sensorischen Nervenzellen) durch Elimination der I-Zellen verhindert wird (Martin and Thomas, 1981a).

Die larvalen Schleimzellen, die nach Bodo und Bouillon (1968) durch Umdifferenzierung ektodermaler Epithelzellen entstehen, betragen ca. 5% der Ektodermzellen. Aus der Arbeit von Weis et al. (1985) kann man entnehmen, daß im anterioren Teil der Planula ca. 9% Schleimzellen, im

posterioren Teil ca. 3% der Ektodermzellen Schleimzellen sind.

Die Nematocyten, Differenzierungsprodukte der Nematoblasten, sind aus dem Entoderm eingewandert.

Die Anzahl der Entodermzellen verdoppelt sich im gezeigten Zeitraum ebenfalls, wobei ab ca. 30 h ihre Zunahme auf die Proliferation der I-Zellen und nachfolgende Differenzierung von Nematoblasten zurückgeführt werden kann.

Neue Erkenntnisse zur Überprüfung eines solchen Modells könnten z.B. durch Ermittlung der genauen Zellzykluszeiten mit Hilfe von radioaktiver Markierung der DNS gewonnen werden. Ferner könnte die selektive Elimination von I-Zellen (z.B. nach Müller, 1968) zu ausgewählten Zeitpunkten der Entwicklung interessante Daten und vielleicht mehr Klarheit über die noch offene Frage der Herkunft der ersten Nematoblasten schaffen.

4.2. Antigenpezifität bei Hydractinia

4.2.1. Unterschiedliche Antikörperfärbung in Total- und Schnittpräparaten

Die Ergebnisse der Immuncytochemie zeigten beim gleichen Antikörper unterschiedliche Färbeergebnisse, je nachdem, ob die Antikörperfärbung an Totalpräparaten oder Schnitten durchgeführt wurde. Bei Totalpräparaten wies die Reaktion auf ein Zelltyp-spezifisches Oberflächenantigen hin. In Schnitten war zusätzlich eine starke Reaktion des Entoderms zu sehen. Es wurde gezeigt, daß die Unfähigkeit des Antikörpers, in das Gewebe tiefer einzudringen, der Grund für eine unvollständige Färbung der Totalpräparate ist, was jedoch für die Klarheit der positiven Färbung der ektodermalen Zellen (I- und Nervenzellen) von Vorteil ist. Bei Totalpräparaten wurde das Entoderm lediglich in den relativ dünnen Tentakeln und Tentakuloiden und im Bereich der Hypostomöffnung von der Antikörperlösung erreicht.

Die betreffende Antigendeterminante ist bei I- und Nervenzellen auf der Zelloberfläche lokalisiert, während sie bei Entodermzellen auch im Zytoplasma und extrazellulär vorhanden ist. Die Frage, ob es sich hierbei um identische Antigene handelt oder nur um kreuzreagierende Moleküle, kann allerdings nur z.B. durch eine Analyse der Antigene selbst beantwortet werden.

4.2.2. Antikörper als Differenzierungsmarker

4.2.2.1. Das Antigen während der Embryonalentwicklung

Eine positive Antikörperreaktion wird erst bei relativ späten Entwicklungsstadien gefunden. Hierbei wird ab ca. 50 h nach und nach das ganze Entoderm gefärbt (Abb. 25). Eine selektive Färbung einzelner Zelltypen, z.B. von I-Zellen ist im Entoderm nicht erkennbar. Jedoch I-Zellen, die in älteren Planulastadien ins Ektoderm ausgewandert sind, zeigen deutlich eine selektive positive Reaktion. Aus der histologischen Untersuchung im 1. Teil der Arbeit ist bekannt, daß die Entstehung von I-Zellen in der Larve relativ früh beginnt (s. Kap. 3.1.7.1.). Es wurde jedoch auch gezeigt, daß frühe und späte I-Zellen morphologisch unterschiedlich sind und daß die I-Zellen erst relativ spät wie typische I-Zellen aussehen (vgl. Abb. 9, 10 und Abb. 4d und 12). Aus der zeitlichen Übereinstimmung zwischen dem Auftreten später, typischer I-Zellen einerseits, positiver Entodermfärbung und positiven I-Zellen im Ektoderm der Planula andererseits kann man schließen, daß der monoklonale Antikörper in der Larve sowohl für Entodermgewebe als auch für I-Zellen spezifisch ist. Die Antigenspezifität der I-Zellen beginnt jedoch erst mit einem gewissen späten Reifezustand dieses Zelltyps, da frühe I-Zellen, die bereits vor der spezifischen Antikörperreaktion vorhanden sind, keine Antikörperfärbung aufweisen.

4.2.2.2. Schicksal des Antigens nach der Metamorphose und bei Adulten

Die I-Zellen behalten das Antigen bei Primärpolypen und adulten Nährpolypen und Geschlechtspolypen. Bei diesen Stadien sind die I-Zellen stets im Ektoderm lokalisiert.

Darüber hinaus wird das Antigen auch von I-Zell-Produkten, den Nervenzellen des Rumpfektoderms exprimiert. Obwohl bei Larven (s. Kap.3.1.7.4.) und Primärpolypen (Grimmelikhuijzen, 1985) bereits Nervenzellen vorhanden sind, konnte hier keine positive Antikörperreaktion gefunden werden. Das bedeutet, daß die adulten Polypen Nervenzellen mit einer anderen Antigenspezifität besitzen.

Außerdem reagieren nicht alle Bestandteile des Nervensystems. Grimmelikhuijzen (1985) konnte mit FMRF-Amid Antikörpern sowohl das Nervenetz des Rumpfs bei Gastrozoiden und Gonozoiden als auch ringförmig angeordnete sensorische Nervenzellen am Hypostom bei Gastrozoiden und Primärpolypen sichtbar machen. Der vorliegende monoklonale Antikörper jedoch färbt nur das Nervenetz des Rumpfs bei Gastrozoiden und Blastostylen.

Die spezifische Entodermfärbung tritt während der späten Larvalentwicklung auf. Sie bleibt bei Adulten erhalten. Selbst bei Gonophoren, die im Lauf einer komplizierten Entwicklung entstehen und aus mehreren Schichten von ursprünglichem Ekto- und Entodermgewebe aufgebaut sind (Hertwig und Hündgen, 1984), lassen sich die Bereiche, die von Entoderm ableitbar sind, noch anfärben. Dies ist in Schnitten von Gonophoren zu sehen, deren Färbung zunächst sehr inhomogen wirkt (Abb.27 und 28). Beim Vergleich mit den Befunden über die Entwicklung der Gonophoren (Avset, 1959; Hertwig und Hündgen, 1984) wird deutlich, daß stets die Strukturen, die vom ursprünglichen Entoderm abstammen, Antikörper-positiv sind. In den beiden Abbildungen sind zwei Gonophoren verschiedenen Reifegrades gezeigt. Abb.27 entspricht dem Stadium I (Abb.32) bei Hertwig und Hündgen (1984), wo sich die jungen Oocyten unterhalb der sich



Abb. 27

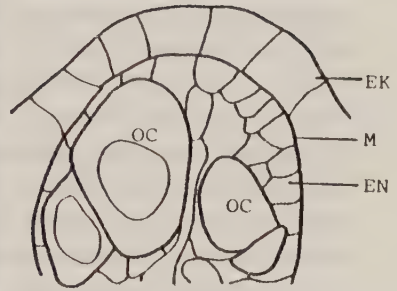


Abb. 32: Gonophorenreifung eines weiblichen Blastostyls. Stadium I (nach Hertwig & Hündgen, 1984)

Zu Abb. 27/28 und 32/33: EK=Ektoderm, EN=Entoderm, OC=Oocyte, MG=Mesogloea, SP=Spadix, GR=Gastralraum



Abb. 28

Die Gonophorenreifung ist noch etwas weiter fortgeschritten wie Stadium IV: die Lagen von Entoderm und Ektoderm um die Oocyten sind nur noch rudimentär bis verschwunden.

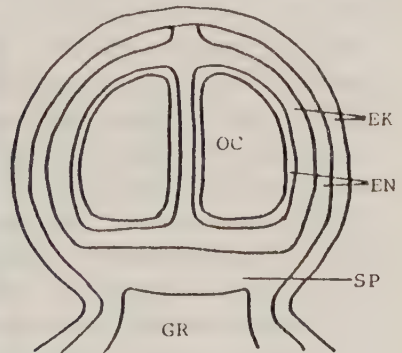


Abb. 33: Stadium IV der Gonophorenreifung (nach Hertwig & Hündgen, 1984).

vorwölbenden Körperwand, noch umgeben von der ursprünglichen Gastrodermis (=Entoderm), befinden. In dieser Zone enthält das Ektoderm zahlreiche Antikörper-positive I-Zellen und die negativen Oocyten liegen inmitten positiver Entodermzellen. In Abb.28 ist der Gonophor schon wesentlich weiter entwickelt, seine Oocyten stehen kurz vor der Ausreifung entsprechend Stadium IV (Abb.33) bis V der oben genannten Arbeit. Die Basis des Gonophors, die antikörperpositiv ist, wird durch den Spadix gebildet, der für die Oocyten eine Art Nährgewebe darstellt und entodermaler Herkunft ist. Die Oocyten selbst sind nur noch von Rudimenten des ursprünglichen Entoderms umgeben, zwischen das sich ausgehend vom Glockenkern Ektoderm eingeschoben hat.

Zwei Differenzierungswege der I-Zellen sind von einem Verlust des Antigens begleitet. Selbst wenn bei Nematoblasten, bei denen eine Interpretation der Färbung aufgrund ihrer dichten Nachbarschaft mit I-Zellen im Rumpfektoderm schwierig ist, eine schwache Antigenizität nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, sind ausdifferenzierte Nematocyten auf jeden Fall negativ. Dies geht sowohl aus der negativen Reaktion der Nematocyten in Tentakeln als auch im Ektoderm ausgewachsener Planulastadien hervor.

Auch bei der Keimzellenreife verschwindet das I-Zell-Antigen, wenn diese zu Beginn der Geschlechtsreife bei Blastostylen wieder ins Entoderm wandern und somit den Weg zu Oogenese eingeschlagen haben.

Die Befunde zeigen, daß der monoklonale Antikörper als Differenzierungsmarker benutzt werden kann, da seine spezifische Bindung nur mit bestimmten Differenzierungszuständen der Zellen korreliert ist. Somit stellt er ein geeignetes Mittel dar, um Differenzierungsvorgänge z.B. beim Wachstum oder bei der Regeneration zu verfolgen.

4.3. Klonpezifität des Antigens und Histokompatibilität

Die unterschiedliche Antikörperreaktion der I-Zellen bedeutet, daß von diesem Zelltyp das betreffende Antigen nur bei einem Teil der getesteten Klone von *Hydractinia* exprimiert wird. Auch die Intensität der Färbung ist klonal verschieden, da auch diese Unterschiede reproduzierbar sind.

Wie bereits erwähnt, kennt man bei *Hydractinia* eine Histoinkompatibilität, die mit dem Verwandtschaftsgrad der Klone korreliert ist. Diese vermutlich genetisch bedingte Fähigkeit zur Gewebserkennung und -Abstoßung und sogar die von Buss et al. (1985) beschriebene Entwicklung einer Selbstabstoßung, einer Art Autoimmunreaktion, macht den Vergleich mit der Gewebserkennung bei höheren Tieren auf Basis von Histokompatibilitätsantigenen verlockend. Auch bei anderen koloniebildenden Cnidaria sind viele Beispiele von Klonspezifität, die sich in der innerartlichen Unverträglichkeit ausdrückt, bekannt (Theodor, 1970; Hildemann et al., 1977; Neigel and Avise, 1983; Müller et al., 1983).

Bei *Botryllus*, auf der niedersten Stufe der Chordaten, ist schließlich eine genetische Kontrolle durch einen einzigen Genort mit multiplen Allelen, bezeichnet als primitives "MHC"-System, vorhanden (Scofield et al., 1982).

Über zelluläre Mechanismen der Gewebserkennung und Abstoßung bei *Hydractinia* herrscht weitgehend Unklarheit. Buss et al. (1984) zeigten, daß Nematocyten das fremde Gewebe angreifen. Bei der Gewebserkennung spielen vermutlich die Epithelzellen des Ektoderms eine Rolle (Buss et al., 1984). Die Tatsache, daß bei *Hydractinia* nach Elimination der I-Zellen die Abstoßungsreaktion unvollständig ist - es findet keine hyperplastische Reaktion statt -, weist darauf hin, daß auch die I-Zellen von Bedeutung sind.

Auch bei *Hydra* wurde eine Immunreaktion nach Parabiose verschiedener Arten gezeigt (Bosch and David, 1986). Hier spielen I-Zellen insofern eine Rolle, als sie von den Epithelzellen des inkompatiblen Partners phagozytiert werden. Daß I-Zellen "Opfer" der Immunreaktion sind, könnte

nach Buss and Green (1986) bedeuten, daß sich hier ein Mechanismus entwickelt hat, durch den verhindert wird, daß I-Zellen als potentielle Keimzellen ein Individuum der gleichen Art gewissermaßen parasitierend besiedeln können ("somatic cell parasitism", Buss, 1982).

Durch die Explantationsversuche in der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen den klonalen Antigenunterschieden und der Histokompatibilität besteht. Die Versuchsergebnisse (Abb.29) zur Fusion/Abstoßung von Tieren aus I'Nv'- und I-Nv'-Kolonien (im Folgenden "+" bzw. "-" genannt) lassen sich in drei Gruppen unterteilen: 3 Ergebnisse zur Kombination ++, 2 Ergebnisse zur Kombination +-, 2 Ergebnisse zur Kombination --. Da als Ergebnisse genau zwei Alternativen (Fusion=F oder Abstoßung=A) möglich sind, gibt es bei insgesamt 7 Ergebnissen 128 (=2⁷) Kombinationsmöglichkeiten von F und A. Eine Korrelation zwischen Antigentyp und Histokompatibilität ist dann vorhanden, wenn in den drei Versuchsgruppen ++, +-, -- zwar verschiedene, innerhalb der Gruppen jedoch gleiche Ergebnisse (d.h. nur F oder A) auftreten. Ein derartiges Ergebnis wurde im vorliegenden Versuch erhalten: dreimal F bei ++, zweimal A bei +-, zweimal A bei --. Die Wahrscheinlichkeit, ein Ergebnis dieses Typs zu erhalten, wenn Antigentyp und Histokompatibilität unabhängige Ereignisse sind, beträgt etwa 0.21 (es gibt 6 Kombinationsmöglichkeiten von F und A zwischen den Gruppen ++, +-, --, deshalb ist die Signifikanz 128/6). Die statistische Signifikanz des vorliegenden Ergebnisses ist also sehr schwach, jedoch ist die Stichprobe sehr klein. Dieses Ergebnis läßt dennoch vermuten, daß es lohnend wäre, einen Zusammenhang zwischen Antigentyp und Histokompatibilität genauer zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Embryonalentwicklung des marinen Hydroiden *Hydractinia echinata* untersucht. Hierbei waren vor allem die Entstehung und Differenzierung der interstitiellen Zellen (I-Zellen) bei der Planularlarve von Interesse.

Anhand von Semidünnschnitten und einer neu entwickelten Mazerationsmethode wird die zelluläre Zusammensetzung während der Larvalentwicklung qualitativ und quantitativ beschrieben.

Die Anzahl der Blastomeren wächst während der ersten 10 h sehr schnell. Die Gastrulation, eine multipolare Delamination, findet im Alter von etwa 10 h statt, anschließend erfolgt die Zellzunahme langsamer. Ab 25 h wird die Larve als Präplanula bezeichnet, die sich durch ihre ovale Form und den Besitz einer Mesogloea auszeichnet. Im Gegensatz zu älteren Befunden bildet die Larve nach der Gastrulation kein Gastrocoel. Bei ausgewachsenen Planularlarven (nach 2-3 Tagen) wird nur noch eine Vermehrung von I-Zellen und Nesselzellen gefunden.

Im Alter von 15 h besitzt der Keim Ektoderm und Entoderm. Die ersten differenzierenden Zellen, identifiziert als frühe I-Zellen (Prä-I-Zellen), treten im Alter von 15 bis 20 h auf. Die Entwicklung von Nesselzellen beginnt im Alter von etwa 25 h.

Die Entwicklung der I-Zellen beginnt relativ früh im Entoderm. Zunächst werden kleine, kompakte Zellen, die sich von typischen I-Zellen morphologisch unterscheiden, gebildet. Im Laufe der Larvalentwicklung differenzieren diese Zellen zu typischen I-Zellen. Spätestens ab dem späten Präplanulastadium sind die I-Zellen auch Vorläufer für Nematoblasten.

Die ausgewachsene Planularlarve besitzt rund 10000 Zellen, davon sind etwa 3000 im Entoderm und 7000 im Ektoderm enthalten. Das Entoderm besteht zu einem großen Teil aus I-Zellen (ca.400) und Nematoblasten (ca.800). Das Ektoderm enthält neben Nematocyten (ca.1000) auch Nervenzellen und Schleimzellen. Ein Modell zum Zellfluß während der Planulaentwicklung wird vorgestellt.

Der zweite Teil der Arbeit umfaßt die Herstellung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers gegen Hydractinia.

Ein Antikörper, der bei Primärpolypen an I-Zellen bindet, wurde in verschiedenen Entwicklungsstadien an Totalpräparaten und histologischen Schnitten untersucht. Es zeigte sich, daß der Antikörper nicht nur an I-Zellen, sondern auch an andere Zelltypen bindet.

Während der Embryonalentwicklung tritt eine Reaktion mit dem Antikörper sehr spät auf. Erst in ausgewachsenen Planularlarven ist eine spezifische Bindung sowohl des Entoderms als auch von I-Zellen vorhanden. Frühe I-Zellen, die im Entoderm bereits vor dem Präplanulastadium entstehen, werden von dem Antikörper nicht erkannt.

Bei adulten Polypen reagiert der Antikörper spezifisch mit I-Zellen und Nervenzellen (Abkömmlinge von I-Zellen) - beide im Ektoderm - und wie bei Planulae mit Entodermgewebe. Andere Differenzierungsprodukte von I-Zellen - Nematocyten und Oocyten - hingegen sind Antikörper-negativ.

Die Expression des Antigens bei I-Zellen ist nicht bei allen untersuchten Hydractinia-Kolonien vorhanden, ist also klonspezifisch. Ein möglicher Zusammenhang dieser Klonspezifität und der bei Hydractinia bekannten Histokompatibilität wird diskutiert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Avset, K. (1959): The gonophore development in the genus *Hydractinia* VAN BENEDEEN. I. *Hydractinia echinata* FLEM. Nytt. Magas. Zool. 8, 25-33.

Ballard, W. (1942): Spawning in *Hydractinia* and *Pennaria*. Biol. Bull. 82, 329-339.

Bedian, V., Oliver, C.E., McCoon, P. and Kauffman, S.A. (1986): A cell surface differentiation antigen of *Drosophila*. Dev. Biol. 115, 105-118,

Bode, H.R. and David, Ch.N. (1978): Regulation of a multipotent stem cell, the interstitial cell of *Hydra*. Prog. Biophys. Molec. Biol. 33, 189-206.

Bodo, F. et Bouillon, J. (1968): Etude histologique du développement embryonnaire de quelques hydroméduses de Roscoff: *Phialidium hemisphaericum* (L.), *Obelia* sp. Péron et Lesneur, *Sarsia eximia* (ALLMAN), *Podocoryne carnea* (SARS), *Gonionemus vertens* AGASSIZ. Cah. de Biol. Mar. 9, 69-104.

Bosch, Th.C.G. (1986): Zellbiologische Untersuchungen am Süßwasserpolyphen *Hydra*: Selbst/Nicht-Selbst Erkennung, Multipotenz der Interstitiellen Stammzellen und ihre Rolle bei der Geschlechtsbestimmung. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität München.

Bosch, Th.C.G. and David, Ch.N. (1986): Immunocompetence in *Hydra*: Epithelial cells recognize self-nonselself and react against it. J. Exp. Zool. 238, 225-234.

Bourne, J.A. (1983): Handbook of immunoperoxidase staining methods. Immunochemistry Laboratory, DAKO CORPORATION.

Boyse, E.A. and Old, L.J. (1969): Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics. Annu. Rev. Gen. 3, 269-290.

Brandtzaeg, P. (1982): Tissue preparation methods for immunocytochemistry. In "Techniques in Immunocytochemistry", Vol.1 (Bullock, G.R. and Petrusz, P., eds.), Academic Press.

Brauer, A. (1891a): Über die Entwicklung von Hydra. Zeitschr.wiss.Zool. 52, 169-216.

Brauer, A. (1891b): Über die Entstehung der Geschlechtsprodukte und die Entwicklung von Tubularia mesembryanthemum ALLM. Zeitschr.wiss.Zool. 52, 551-579.

Brinn, N.T. and Pickett, J.P. (1980 ?): Glycol methacrylate for routine, special stains, histochemistry, enzyme histochemistry and immunohistochemistry. J.of Histotechnology 2(3), 125-130.

Bronstein, J.N. und Semendjajew, K.A. (1975): Taschenbuch der Mathematik. BSB B.G.Teubner Verlagsgesellschaft, Leipzig.

Brower, D.L., Piovant, M. and Reger, L.A. (1985): Developmental analysis of drosophila position-specific antigens. Dev.Biol. 108, 120-130.

Bunting, M. (1894): The origin of the sex-cells in Hydractinia and Podocoryne and the development of Hydractinia. J.Morph. 9, 203-236.

Burns, J. (1975): Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. Histochemistry 43, 291-294.

Buss, L.W. (1982): Somatic cell parasitism and the evolution of somatic tissue compatibility. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 5337-5341.

Buss, L.W. and Green, D.R. (1986): Histocincompatibility in vertebrates: the relict hypothesis. J.Comp.Devel.Immunol., in press.

Buss, L.W., McFadden, C.S. and Keene, D.R. (1984): Biology of Hydractiniid hydroids: 2. Histocompatibility effector system/competitive mechanism mediated by nematocyst discharge. *Biol. Bull.* 167, 139-158.

Buss, L.W., Moore, J.L. and Green, D.R. (1985): Autoreactivity and self-tolerance in an invertebrate. *Nature* 313, 400-402.

Campbell, R.D. (1983): Preparing histological sections for light microscopy. In "Hydra: Research Methods" (Lenhoff, H.M. ed.), Plenum Press, New York and London.

Campbell, R.D. and David, Ch.N. (1974): Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. II. Interstitial cells. *J. Cell Sci.* 16, 349-358.

Carnegie, J.A., McCully, M.E. and Robertson, H.A. (1980): Embedment in glycol methacrylate at low temperature allows immunofluorescent localization of labile tissue protein. *J. Histochem. Cytochem.* 28(4), 308-310.

Chia, F. and Crawford, B. (1977): Comparative fine structural studies of planulae and primary polyps of identical age of the sea pen, *Ptilosarcus gurneyi*. *J. Morph.* 151, 131-158.

Cowden, R.R. and Curtis, S.K. (1981): Microfluorometric investigations of chromatin structure. I. Evaluation of nine DNA-specific fluorochromes as probes of chromatin organisation. *Histochemistry* 72, 11-23.

David, Ch.N. (1972): A quantitative method for maceration of *Hydra* tissue. *Wilh. Roux's Arch. Entw. Mech. Org.* 171, 259-268.

David, Ch.N. (1982): Stem cell proliferation and differentiation in *Hydra*. In "Identification and characterization of stem cell populations" (Potten, C.S. ed.), Churchill Livingstone, Edinburgh.

- David, Ch.N. and Gierer, G. (1974): Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 16, 359-375.
- Dawydoff, C. (1925): *Embryologie comparée des invertébrés*. Masson, Paris.
- Denk, H., Radaszkiewicz, T. and Weirich, E. (1977): Pronase pretreatment of tissue sections enhances sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) technique. *J. Immun. Meth.* 15, 163-167.
- Dunne, J.F., Javois, L.C., Huang, L.W. and Bode, H.R. (1985): A subset of cells in the nerve net of *Hydra oligactis* defined by a monoclonal antibody: Its arrangement and development. *Dev. Biol.* 109, 41-53.
- Fenderson, B.A., O'Brien, D.A., Millette, C.F. and Eddy, E.M. (1984): Stage-specific expression of three cell surface carbohydrate antigens during murine spermatogenesis detected with monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 103, 117-128.
- Fennhoff, F.J. (1980): Embryonic development of *Tubularia crocea* AGASSIZ with special reference to the formation of the interstitial cells. In "Developmental and Cellular Biology of Coelenterates" (Tardent, P. and Tardent, R. eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Gachelin, G., Kemler, R., Kelly, F. and Jacob, F. (1977): PCC4, a new cell surface antigen common to multipotential embryonal carcinoma cells, spermatozoa and mouse early embryos. *Dev. Biol.* 57, 199-209.
- Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. and Howard, J.C. (1977): Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* 266, 550-552.
- Gierer, A. (1974): *Hydra* as a model for the development of the biological form. *Sci. Am.* 231, 44-54.

Glätzer, K.H. (1971): Die Ei- und Embryonalentwicklung von *Corydendrium parasiticum* mit besonderer Berücksichtigung der Oocyten-Feinstruktur während der Vitellogenese. Helgol.wiss.Meeresunters. 22, 213-280.

Goding, J.W. (1983): Monoclonal antibodies: Principle and practice. Academic Press.

Goodman, C.S., Bastiani, M.J., Doe, Ch.Q., du Luc, S., Helfand, S.L., Kuwada, J.Y. and Thomas, J.B. (1984): Cell recognition during neural development. Science 225, 1271-1279.

Gossett, L.A. and Hecht, R.M. (1980). A squash technique demonstrating embryonic nuclear cleavage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. J.Histochem.Cytochem. 28, 507-510.

Grimmelikhuijzen, C.J.P. (1985): Antisera to the sequence Arg-Phe-Amide visualize neuronal centralization in hydroid polyps. Cell Tissue Res. 241, 171-182.

Hargitt, Ch.W. (1903): The early development of *Eudendrium*. Zool.Jb.Abt.Morph. 20, 258-276.

Harm, K. (1903): Die Entwicklungsgeschichte von *Clava squamata*. Z.wiss.Zool. 73, 115-166.

Hauenschild, C. (1954): Genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen über Intersexualität und Gewebeverträglichkeit bei *Hydractinia echinata* FLEMM. (Hydroz.Bougainvill.). Wilh.Roux's Arch.Entw.Mech.Org. 147, 1-41.

Hauenschild, C. und Kanellis, A. (1953): Experimentelle Untersuchungen an Kulturen von *Hydractinia echinata* FLEMM. zur Frage der Sexualität und Stockdifferenzierung. Zool.Jb.Abt.Allg.Zool.Physiol. 64, 1-13.

- Hautzer, N.W., Wittkuhn, J.F. and Mccaughey, W.T.E. (1980): Trypsin digestion in immunoperoxidase staining. J.Histochem.Cytochem. 28, 52-53.
- Hertwig, I. und Hündgen, M. (1984): Gonophorenbildung und Keimzellenentwicklung bei *Hydractinia echinata* FLEMMING 1928 (Hydrozoa, Athecata). Zool.Jb.Anat. 112, 113-136.
- Hildemann, W.H., Raison, R.L., Cheung, G., Hull, C.J., Akaka, L. and Okamoto, J. (1977): Immunological specificity and memory in a scleractinian coral. Nature 270, 219-223.
- Holstein, Th. (1981): The morphogenesis of nematocytes in *Hydra* and *Forskalia*: An ultrastructural study. J.Ultrastructure Res. 75, 276-290.
- Huang, S., Minassian, H. and More, J.D. (1976): Application of immunofluorescent staining paraffin sections improved by trypsin digestion. Lab.Invest. 35(4), 383-390.
- Ivker, F.B. (1972): A hierarchy of histo-incompatibility in *Hydractinia echinata*. Biol.Bull. 143, 162-174.
- Johnson, G.D. and Araujo, G.M. (1981): A simple method for reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. J.Immun.Meth. 43, 349-350.
- Kennett, R. (1980): Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase. In "Monoclonal Antibodies" (Kennett, R., McKearn, T.J. and Bechtol, K. eds.), Plenum, New York.
- Kleinenberg, N. (1872): *Hydra*. Eine anatomisch-entwicklungsgeschichtliche Untersuchung. Leipzig.
- Korotneff, A. (1883): Zur Kenntnis der Embryologie von *Hydra*. Zeitschr.wiss.Zool. 38, 315-323.

- Kühn, A. (1914): Entwicklungsgeschichte und Verwandtschaftsbeziehungen der Hydrozoen. 1. Teil. Die Hydroiden. *Ergeb. Fortschr. Zool.* 4, 1-284.
- Lentz, H. (1965a): The fine structure of differentiating interstitial cells in *Hydra*. *Z. Zellforsch.* 67, 547-560.
- Littlefield, C.L., Dunne, J.F. and Bode, H.R. (1985): Spermatogenesis in *Hydra oligactis*: I. Morphological description and characterization using a monoclonal antibody specific for cells of the spermatogenic pathway.. *Dev. Biol.* 110, 308-320.
- Martin, V.J. (1986): Elimination of interstitial cells, nematoblasts and nematocytes in a hydrozoan planula using hydroxyurea. submitted for publication
- Martin, J.V. and Archer, W.E. (1986): Migration of interstitial cells and their derivatives in a hydrozoan planula. *Dev. Biol.* 116, 486-496.
- Martin, V.J. and Thomas, M.B. (1977): A fine-structural study of embryonic and larval development in the gymnoblastic hydroid *Pennaria tiarella*. *Biol. Bull.* 153, 198-218.
- Martin, V.J. and Thomas, M.B. (1981a): The origin of the nervous system in *Pennaria tiarella*, as revealed by treatment with colchicine. *Biol. Bull.* 160, 303-310.
- Martin, V.J. and Thomas, M.B. (1981b): Elimination of the interstitial cells in the planula larva of the marine hydrozoan *Pennaria tiarella*. *J. Exp. Zool.* 217, 303-323.
- Martin, V.J. and Thomas, M.B. (1983): Establishment and maintenance of morphological polarity in epithelial planulae. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 102, 18-24.
- McFadden, C.S., McFarland, M.J. and Buss, L.W. (1984): Biology of hydractiniid hydroids. 1. Colony ontogeny in *Hydractinia echinata* (FLEMMING). *Biol. Bull.* 166, 54-67.

- Mergner, H. (1957): Die Ei- und Embryonalentwicklung von *Eudendrium racemosum* CAVOLINI. Zool.Jb.Anat.Ontog. 76, 63-164.
- Mishell, B.B. and Shiigi, S.M. (1980): Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Morgenstern, P. (1901): Untersuchungen über die Entwicklung von *Cordylophora lacustris*. Z.wiss.Zool. 70, 567-591.
- Müller, W.A. (1964): Experimentelle Untersuchungen über Stockentwicklung, Polypendifferenzierung und Sexualentwicklung bei *Hydractinia echinata*. Wilh.Roux's Arch.Entw.Mech. 155, 181-268.
- Müller, W.A. (1967): Differenzierungspotenzen und Geschlechtsstabilität der I-Zellen von *Hydractinia echinata*. Wilh.Roux's Arch.Entw.Mech. 159, 412-432.
- Müller, W.A. (1968): Elimination der I-Zellen durch alkylierende Cytostatika und deren Effekte auf die Embryonalentwicklung bei *Hydractinia echinata*. Exp.Cell Res. 49, 448-458.
- Müller, W.A. und Buchal, G. (1973): Metamorphose-Induktion bei Flanulalarven. II. Induktion durch monovalente Kationen. Die Bedeutung des Gibbs-Donnan-Verhältnisses und der Na^+/K^+ -ATPase. Wilh.Roux's Arch.Entw.Mech. 173, 122-135.
- Müller, E.A., Maidhof, A., Zahn, R.K. and Müller, J. (1983): Histoincompatibility reactions in the Hydrocoral *Millepora dichotoma*. Coral Reefs 1, 237-241.
- Neigel, J.E. and Avise, J.C. (1983): Clonal diversity and population structure in a reef-building coral, *Acropora cervicornis*: self-recognition analysis and demographic interpretation. Evolution 37(3), 437-453.

Newport, J. and Kirschner, M. (1982): A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. Characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell* 30, 675-686.

Noda, K. and Kanai, Ch. (1980): An ultrastructural observation on the embryogenesis of *Pelmatohydra robusta*, with special reference to "germinal dense bodies". In "Developmental and Cellular Biology of Coelenterates" (Tardent, P. and Tardent, R. eds.), Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Oi, V.T. and Herzenberg, L.A. (1980): Immunglobulin-producing hybrid cell lines. In "Selected Methods in Cellular Immunology" (Mishell, B.B. and Shiigi, S.M. eds.), W.H. Freeman, San Francisco.

Putnam, F.W. (1943): The chemical modification of proteins. In "The Proteins", Vol.1. (Neurath, K.B. ed), Academic Press, New York.

Reading, M. (1977): A digestion technique for the reduction of background staining in the immunoperoxidase method. *J.Clin.Pathol.* 30, 88-90.

Reuter, M, Wikgren, M. and Lehtonen, M. (1986): Immunocytochemical demonstration of 5-HT-like and FMRF-amide-like substances in whole mounts of *Microstomum lineare* (Turbellaria). *Cell Tissue Res.* 246, 7-12.

Romeis, B. (1968): *Mikroskopische Technik*. R. Oldenbourg Verlag, München, Wien.

Schmid, V., Stidwell, R., Bally, A., Marcum, B. and Tardent, P. (1981): Heat dissociation and maceration of marine Cnidaria. *Wilh. Roux's Arch Entw. Mech.* 190, 143-149.

Schmidt, T. and David, Ch.N. (1986): Gland cells in *Hydra*: cell cycle kinetics and development. *J. Cell Sci.* 85, 197-215.

- Scofield, V.L., Schlumpberger, J.M., West, L.A. and Weissman, I.L. (1982): Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system. *Nature* 295, 499-502.
- Siewing, R. (1969): Lehrbuch der vergleichenden Entwicklungsgeschichte der Tiere. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin.
- Slautterback, D.B. and Fawcett, D.W. (1959): The development of the cnidoblasts of Hydra. An electron microscope study of cell differentiation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 441-452.
- Spragg, J.H., Bebbington, C.R. and Roberts, D.B. (1982): Monoclonal antibodies recognizing cell surface antigens in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 89, 339-352.
- Springer, T.A. (1980): Cell-surface differentiation in the mouse: Characterization of "jumping" and "lineage" antigens using xenogeneic rat monoclonal antibodies. In "Monoclonal Antibodies" (Kennett, R.H., McKearn, T.J. and Bechtol, K.B. eds.), Plenum, New York.
- Summers, R.G. and Haynes, J.F. (1969): The ontogeny of interstitial cells in *Pennaria tiarella*. *J. Morph.* 129, 81-88.
- Takamiya, H., Bodemer, W. and Vogt, A. (1978): Masking of protein antigen by modification of amino groups using carbobenzoxychloride (benzyl chloroformate) and de-masking treatment with nonspecific protease. *J. Histochem. Cytochem.* 26, 914.
- Takamiya, H., Batsford, S. and Vogt, A. (1980): Prerequisites for postembedding staining. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 1041-1049.
- Tardent, P. (1978): Coelenterata, Cnidaria. In "Morphogenese der Tiere", Erste Reihe: Deskriptive Morphogenese, Lieferung 1:A-I, (Seidel, F. Hrsg.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Teissier, L. et Teissier, G. (1927): Les principales étapes du développement d'*Hydractinia echinata*. Bull. Soc. Zool. France 52, 537-547.

Theodor, I. (1970): Distinction between "self" and "not-self" in lower invertebrates. Nature 227, 690-692.

Van de Vyver, G. (1964): Étude histologique du développement d'*Hydractinia echinata* (FLEM.). Cahiers de Biologie Marine 5, 295-310.

Van de Vyver, G. (1967): Étude du développement embryonnaire des hydraires athécates (gymnoblastique) à gonophores. I. Formes à planula. Arch. de Biol. 78, 451-518.

Van de Vyver, G. (1980): A comparative study of the embryonic development of Hydrozoa athecata. In "Developmental and cellular biology of coelenterates" (Tardent, P. and Tardent, R., eds.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Wasserthal, W. (1973): Zur Ei- und Embryonalentwicklung des Hydroidpolypen *Eudendrium armatum*. Helgol. Wiss. Meeresunters. 25, 93-125.

Watanabe, M., Palter, K.B. and Mahowald, A.P. (1982): Monoclonal antibodies recognize different components of the *Drosophila* embryo. J. Cell Biol. 95, 148a.

Weiler-Stolt, B. (1960): Über die Bedeutung der interstitiellen Zellen für die Entwicklung und Fortpflanzung mariner Hydroiden. Wilh. Roux's Arch. Entw. Mech. 152, 398-454.

Weill, R. (1934): Contribution à l'étude des Cnidaires et de leurs nématocystes. 1. Recherches sur les nématocystes (morphologie - physiologie - développement). 2. Valeur taxonomique du cnidome. Trav. Stn. Zool. Wimereux 10/11, 1-701.

Weis, V.M., Keene, D.R. and Buss, L.W. (1985): Biology of hydractiniid hydroids. 4. Ultrastructure of the planula of *Hydractinia echinata*. Biol. Bull. 168, 403-418.

Werner, B. (1965): Die Nesselkapseln der Cnidaria, mit besonderer Berücksichtigung der Hydroida. I. Klassifikation und Bedeutung für die Systematik und Evolution. Helgol. wiss. Meeresunters. 12(1/2), 1-39.

Werner, J. (1984): Ein neues Kunststoff-Einbettmedium für die Lichtmikroskopie: Das Glykol-Methacrylat LKB-HistoResin. mta praxis 30, 675-679.

White, R.A.H., Perrimon, N. and Gehring, W.J. (1984): Differentiation markers in the Drosophila ovary. J. Embryol. Exp. Morphol. 84, 275-286.

Wulfert, J. (1902): Die Embryonalentwicklung von Gonothyrea loveni ALLM.. Z. Wiss. Zool. 71, 296-326.

Yaross, M.S., Westerfield, J., Javois, L.C. and Bode, H.R. (1986): Nerve cells in Hydra: Monoclonal antibodies identify two lineages with distinct mechanisms for their incorporation into head tissue. Dev. Biol. 114, 225-237.

Yoshida, M. (1959): Spawning in coelenterates. Experientia 15, 11-12.

Yu, S., Westfall, J.A. and Dunne, J.F. (1985): Light and electron microscopic localization of a monoclonal antibody in neurons in situ in the head region of Hydra. J. Morph. 184, 183-193.

7. ANHANG

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt allen, die beim Zustandekommen der Arbeit mitgeholfen haben.

Ich danke Prof. David herzlich für die Betreuung der Arbeit, für die Hilfe und wertvolle Diskussion, die die Arbeit immer wieder voranbrachten.

Dr. Tobias Schmidt hat mich in die Arbeit in der Zellkultur eingewiesen und mich immer wieder vor allem bei praktischen Problemen der Arbeit unterstützt. Dafür danke ich ihm ganz besonders.

Dr. Wolfgang Schäfer von der Universität Erlangen danke ich herzlich dafür, daß er Präparate für die Elektronenmikroskopie angefertigt und mir zur Verfügung gestellt hat.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung danke ich für ihre Diskussionsbereitschaft.

Die Arbeit wurde durch das DFG-Projekt Schm 510/4-1-2 gefördert.

LEBENS LAUF

Munck, Adelheid Maria Luise

31.12.1955	geboren in München
1962 - 1966	Besuch der Volksschule an der Weißenseestraße in München
1966 - 1968	Besuch des Städt.Luisengymnasiums in München
1968	Umzug nach Inzell/Traunstein
1968 - 1975	Besuch des Chiemgaugymnasiums in Traunstein
Juli 1975	Abitur
1975 - 1976	Studium Geowissenschaften an der LMU
1976 - 1984	Studium Biologie an der LMU
1979 - 1980	Studium der Biologie am University College of Swansea/Großbritannien durch ein Stipendium der Universität München
Juni 1984	Diplom in Biologie
1984 - 1986	Doktorarbeit am Zoologischen Institut der LMU

